

微生物と光

著者	東北大学遺伝生態研究センター
雑誌名	IGEシリーズ
巻	2
ページ	1-76
発行年	1989-02
URL	http://hdl.handle.net/10097/49087

IGEシリーズ 2*

微生物と光



IGE

東北大学遺伝生態研究センター
Institute of Genetic Ecology

I G Eシリーズの発刊にあたって

地球上の環境は、今、かつてない大きな問題に当面しております。世界各地で進行している生態系の急速な変化のなかには、人間生活に深刻な影響をもたらす可能性のあるものが、多数含まれています。一方、人間の活動が宇宙空間へと拡がるにつれ、地球外生態系の構築が、新しい課題として登場しつつあります。生態系の崩壊を防ぎ、より豊かな環境を創造するための科学的努力が、今日ほど強く求められている時はありません。

本研究センターは、DNA 分子技術を中心に遺伝子的段階にまで到達した生物研究の諸成果を生かし、生態系における生物の生活を一層深く解明し、新たな人間環境の創造に貢献することを目指しております。いうまでもなく、この課題はきわめて学際的であり、多分野の研究者との相互交流と協力によって、はじめて達成されるものであります。本研究センターでは、ワークショップによる研究者間の討論と意見交換を重視するとともに、その成果をより多くの方々にご利用いただく出版活動にとり組んでおります。ここに発刊します IGE (Institute of Genetic Ecology の略) シリーズも、こうした努力

の一環であります。

本シリーズの内容は、多岐にわたる可能性をもっておりますが、3つのタイプに大きく類別されるだろうと考えております。すなわち、(i) 特定のテーマ、又はトピックについての解明に関するもの（*印を付します）、(ii) 特定のテーマ又はトピックに関する最新の文献、実験法の紹介に重点をおくもの（**印）、そして(iii) 新しい可能性を求める学際的交流、対話を試みるもの（***印）であります。

このIGEシリーズが、多方面の方々のお役に少しでも立つことを願って、発刊の辞とします。

1989年3月

東北大学遺伝生態研究センター

❖ 目 次 ❖

ワークショップ「微生物と光」

開催の目的と意義 大瀧 保	1
---------------------	---

バクテリアと光

光合成細菌による水素生産 伊藤 一敏	3
--------------------------	---

真性粘菌と光 上田 哲男	11
--------------------	----

細胞性粘菌と光 前田 靖男	19
---------------------	----

接合菌類と光 大瀧 保	23
-------------------	----

子のう菌, 不完全菌類と光 熊谷 忠	29
--------------------------	----

担子菌類と光 鎌田 堯	43
-------------------	----

藻類と光 (I)

光走性を中心として — 単細胞鞭毛藻類の

光運動反応の作用スペクトルと光受容部位 —

渡辺 正勝	47
-------------	----

藻類と光 (II)

光屈性を中心にして 片岡 博尚	57
-----------------------	----

高等植物と光からのコメント 菅井 道三	67
---------------------------	----

ワークショップ「微生物と光」のおわりに

大瀧 保	75
------------	----

ワークショップ「微生物と光」

開催の目的と意義

大 瀧 保

動物から植物まで、ほとんど全ての生物はその行動や形態形成、さらには生活のためのエネルギー確保まで、何らかの形で光に依存し、また制御を受けている。その光反応はしかしながら、光捕獲の量子レベルの過程から、これら生物の示す最終的な巨視的反応に至るまでの実に長い連鎖反応である。この長い連鎖反応過程において、最も初めの過程である光捕獲の機構はこの連鎖反応の素過程を時系的に解明する場合、その糸口として特に重要である。これまで、この光捕獲の機構、すなわち光受容体の特性のある程度解明された、ロドプシンの関与する視覚、クロロフィルやカロチンの関与する光合成、そしてフィトクロムの関与する高等植物の形態形成などに関する研究は近年急速に進歩し、それらの機構は分子のレベルで解明されるようになった。

一方、菌類や藻類を含む、いわゆる下等植物においては、その形態形成や能力（行動）が青色光や紫外光などの短波長光によって大きく制御されているが、その光捕獲色素がまだ解明されていないこともあって、その研究は、上記の例に比較して未だ現象論に留まっていることは否めない。この、いわゆる青色光反応の研究では、これまで限られた研究者が個々の材料で、各自の得意とする手法を用いて、それぞれ興味ある事実を発見してきた。これらの事実は、たとえその多くが現象的なものであっても、将来、長い光連鎖反応を解明していく上で、各素過程の鎖の輪となる非常に重要なものである。

このような現状に立って、本ワークショップでは、異なる環境条件下で生育し、異なる生活様式を示している青色光利用生物、特に下等植物を中心にして、これまでこれら生物において明らかにされた事実を総合的に把握し、これらの鎖を繋ぐための今後の共通の解析法を模索するものである。

バクテリアと光

光合成細菌による水素生産

伊 藤 一 敏

1. はじめに

光合成細菌は、自然界において広く水圏に棲息分布しており、太陽エネルギーと適当な電子供与体（有機化合物または還元型イオウ化合物）を用いて酸素非発生型光合成とアンモニア欠乏状態において窒素固定を行っている。光合成細菌は、光合成色素としてクロロフィルと構造が極めて似ているバクテリオクロロフィルとカロチノイドを持ち、Rhodospirillaceae, Chromatiaceae, Ectothiorhodospiraceae, Chlorobiaceae, Chloroflexaceae の5科に分類されている。光合成細菌において光合成、窒素固定といった生物の持つ重要な機能についてのみならず、その多様な生理的特徴について多くの基礎的研究がなされているとともに、廃水処理、SCP (single cell protein)、水素、ビタミン、色素などの生産など多くの応用研究もなされている。本章では、光合成細菌において紅色非硫黄性細菌と呼ばれる Rhodospirillaceae に属する光合成細菌に限定し、光合成細菌による水素生産についての研究経過と今後の展望について紹介したい。

2. 光合成細菌における水素生成系^{9,10)}

紅色非硫黄性光合成細菌を嫌気、光照射条件下でアンモニア制限培地を用いて培養すると水素の生成が観察される。このような光依存性の水素生成は、1949年、Gest と Kamen によって発見された⁵⁾。光合成細菌における

水素生成系に關与する酸素系は、ヒドロゲナーゼとニトロゲナーゼの二つの酵素系が考えられる。ヒドロゲナーゼは、酸化型フェレドキシンを電子受容体として水素をプロトンに酸化する。即ち、水素の吸収反応を触媒するが、この反応は可逆的であり、この逆反応の結果、水素を生成すると考えられる。一方、窒素固定酵素であるニトロゲナーゼは、還元型フェレドキシンを電子供与体として本来の基質はもちろん、アザイド、シアン、アセチレンなど多くの化合物を還元する。この還元反応は、不可逆的であり、2電子あたり4ATPが使われる。ニトロゲナーゼは、光エネルギーを利用したATP生産系と還元型フェレドキシンを利用し水素生成を触媒すると考えられる。筆者らは *Rhodopseudomonas palustris* A を用いて水素生成系における二つの酵素系の役割を明らかにすることとし、種々の実験の結果、1) アンモニアを培地に添加すると水素生成とニトロゲナーゼ活性が著しく阻害されるが、ヒドロゲナーゼ活性は影響を受けない 2) 水素生成は、ニトロゲナーゼと相関関係を示すが、ヒドロゲナーゼとは関連性がない 3) ニトロゲナーゼは、活性中心にモリブデンを含むことが知られており、モリブデン欠乏培地において、水素生成とニトロゲナーゼ活性は低レベルに抑えられるが、ヒドロゲナーゼ活性は変化しない 4) 窒素固定能欠損変異株の水素生成とニトロゲナーゼ活性は著しく低下しているが、ヒドロゲナーゼ活性は親株と同程度であることなどが示され、少なくとも *Rp. palustris* A における水素生成は、ニトロゲナーゼによって触媒されることが明らかにされた。また、*Rhodobacter capsulatus* においてヒドロゲナーゼ欠損変異株は、親株に比較して高い水素生成能を示すことが報告されている。従って、紅色非硫黄性光合成細菌において、一般的にニトロゲナーゼが水素の生成を触媒し、ヒドロゲナーゼが水素の吸収を触媒すると考えられる。

光合成細菌による水素の生産には電子供与体として有機化合物が必要であるが、種々の有機酸及び糖について検討した結果、乳酸とリンゴ酸が最も効果的であった。また、水素の実用的生産を考えるとニトロゲナーゼの安定性と活性維持が極めて重要である。*Rp. palustris* A のニトロゲナーゼを窒素気相下で誘導合成させ、無窒素条件下での水素生成を指標にニトロ

ゲナーゼの安定性を推定した結果、その半減期は約 40 時間であつた。ニトロゲナーゼの誘導合成並びに活性維持のために窒素を用いることは、一定期間毎に窒素ガスを用いて培養する必要がある。従つて、窒素源としてニトロゲナーゼを誘導合成させるもう一つの化合物であるグルタミン酸を用いる方がより効果的であると考えられる。既に述べたように、ニトロゲナーゼはアンモニアで抑制阻害されるが、窒素源としてグルタミン酸を用いた場合、何故アンモニアが生成されないのか疑問視される。その理由として、水素が生成されている状態では細胞内が還元状態にあり、酸化型ピリジヌクレオチドを必要とするグルタミン酸脱水素酵素によるグルタミン酸からのアンモニアと α -ケトグルタル酸を生成する反応が殆ど進行しないことが考えられる。以上述べたことから、光合成細菌による水素生産には、炭素源として乳酸を、窒素源としてグルタミン酸を用いることが適當であると考えられる。

3. 水素生産に適した光合成細菌の分離と水素生産のモデル実験^{11~14,17)}

Rp. palustris A を用いた水素生成実験から、水素生成がニトロゲナーゼによって触媒されること、炭素源として乳酸が、窒素源としてグルタミン酸が効果的であることが示されたが、水素生成速度は $40\sim 50\ \mu\text{l/hr/mg dry cells}$ であり、Hillmer と Gest らが報告した最大水素生成速度、 $130\ \mu\text{l/hr/mg dry cells}$ ⁶⁾ と比較するとかなり低い。また、嫌気、光照射条件下で培養するために密閉型の培養槽を使用する必要がある、培養槽内が比較的高温になることが予想される。従つて、自然界から水素生成能が高くかつ比較的高温に耐性な光合成細菌の分離が望まれる。このような観点から仙台地区、韓国、タイ国において光合成細菌の分離を試みた結果、韓国から分離された SL16 株と KM113 株、タイ国から分離された B5 株が $133\sim 138\ \mu\text{l/hr/mg dry cells}$ の高い活性を示した。特に、B5 株は、仙台地区及び韓国から分離された光合成細菌において水素生成能が低下する 40°C で最大水素生成能を示し、タイ国の気候に適応した比較的高温に耐性を持つ光合成細菌であることが示された。B5 株は、同定実験の結果、*Rhodop-*

seudomonas (Rhodobacter) sphaeroides B5 と命名され、水素生産のモデル実験に供された。

光合成細菌による実用的水素生産においては、自然環境下で太陽光を用いて培養することが望ましい。筆者らは、東北大学農学部においてルーflasコ型アクリル製培養槽（高さ：100 cm，幅：50 cm，厚さ：5 cm）を野外の日当たりの良い場所に設置し、50 mM 乳酸，5 mM グルタミン酸を含む最少培地，331 を用いて培養した。培養状態を知るために温度計，pH メーター，照度計及びガスメーターを用いて測定し，発生したガスは，ガスクロマトグラフィーによって分析した。1981 年 4 月 20 日から 5 月 15 日まで 25 日間培養した結果，96.1% の乳酸を消費し，177.2 l の水素が生産された。乳酸が二酸化炭素と水素に完全に分解したとして計算した乳酸の水素への転換率は 78% という極めて良好な成績が得られ，太陽光を用いた自然環境下での光合成細菌による水素の生産が十分可能であることが示された。

次に，半連続および連続培養について検討した。半連続培養は，ルーflasコ型アクリル製培養槽（高さ：34 cm，幅：70 cm，厚さ：5 cm）を野外の日当たりの良い場所に設置し，25 mM 乳酸，5 mM グルタミン酸を含む最少培地，61 を用いて培養した。1982 年 5 月 25 日から 7 月 10 日まで 45 日間培養し，その期間中，適当な間隔で乳酸とグルタミン酸を添加した。この結果，使用した乳酸の 90.9% を消費し，125.4 l の水素が生産され，乳酸の水素への転換率は 62.5% であった。半連続培養試験の結果，安定かつ良好な水素生産が示されたので連続培養試験を行った。光合成細菌は，長期間の培養でも安定な懸濁状態を示す *Rb. sphaeroides* B6 が使用され，培養槽は半連続培養の場合と同じものを用いた。培養は研究室内で行い，培養温度は 33°C，光は白熱ランプを用い約 30 klux の照射量で 12 時間毎に明，暗条件を設定した。25 mM 乳酸，5 mM グルタミン酸を含む最少培地で，61 を用い，培養開始 48 時間後から希釈率，0.041 l/hr で新鮮培地で連続的に添加した。12 日間培養した結果，平均水素生産量，1874 ml/day，平均水素生産速度，125.8 ml/hr/g dry cells，乳酸の水素への転換率は 68.8% であった。これらの結果，光合成細菌による水素生産は，連続運転で安定かつ効率良く行えることが示され，実用化のためには炭素源として用いた高価な

乳酸のかわりにより安価な有機物の利用が重要な課題であると考えられる。

4. 光合成細菌による水素生産の低コスト化への課題^{1,2)}

光合成細菌による実用的水素生産が、太陽光を用いて自然環境下で十分可能であることは既に述べたが、炭素源として高価な乳酸を使用することは経済性の上から大きな問題である。従って、より安価でかつ安定に供給できる炭素源、例えば農業廃棄物の利用などが望まれる。このような観点からセルロース、キシラン、ペクチン、デンプンなどを利用し生育できる光合成細菌の分離を試みた。この結果、生デンプンを唯一炭素源とした培地で生育するいくつかの光合成細菌を分離し、その中でタイ国バンコク市周辺から分離された *Rhodocyclus* sp. T20 が、各種生デンプンを分解し良好な水素生産能を示した。しかし、セルロース、キシラン、ペクチンなどを利用し生育する光合成細菌の分離は、成功していない。光合成細菌による生デンプンを利用した水素生産の基礎研究として、T20 株の生産する生デンプン分解性アミラーゼを精製した。本アミラーゼは、分子量、95,000 (58 K のサブユニットからなる二量体) の α -アミラーゼであり、キャッサバデンプンより馬鈴薯デンプンを効率良く分解すること、プルラナーゼ活性を示すことなど従来知られているアミラーゼとは異なり、酵素学的に興味深い。T20 株の生デンプンからの水素生産能を向上させる目的として、生デンプン分解性アミラーゼ遺伝子のクローニングを試みているが、まだ成功していない。最近、タイ国の研究者が、セルロースを利用して生育できる光合成細菌の分離に成功しているが、その活性は極めて低く水素生産に利用するには困難であると考えられる。以上述べたように、光合成細菌による生デンプンを利用した実用的水素生産は可能性があり、経済性からも魅力的であるが、他の安価な有機物、特にセルロースを水素生産に利用するためには、次に述べる遺伝子操作を用いた分子育種に期待する以外方法がないように思われる。

5. 光合成細菌による実用的水素生産における今後の課題

光合成細菌による実用的水素生産について述べてきたが、今後の課題として次のようなことが考えられる。1) 水素生産能の向上, この点に関しては, 光リン酸化反応による ATP と有機化合物からの還元力供給効率の向上およびニトロゲナーゼ活性の向上などが考えられるが, 各機構の基礎的理解と密接に関連しており, 長期間の研究が必要である。2) ニトロゲナーゼ遺伝子の構成的発現, 即ち, アンモニアによるニトロゲナーゼ遺伝子の発現抑制を解除させることは, 光合成細菌による水素生産のために種々の基質を利用することが可能になる。例えば, 光合成細菌を廃水処理に利用しながら水素をエネルギーとして回収することも可能になると考えられる。この目的を達成するには光合成細菌における窒素固定遺伝子の発現調節機構の解明が必要である。3) 安価な炭素源の利用, この点に関しては, 生デンプンの利用は十分可能性があるが, 他の安価な多糖, セルロース, キシラン, ペクチンなどの利用は, これらの多糖を効率的に分解する光合成細菌の分離に成功しておらず極めて難しい。この問題を克服するには, 他の微生物から目的の多糖の関与する遺伝子を光合成細菌に導入し, 光合成細菌が目的の多糖を分解できるように育種する方法がある。これらの課題を解決していくには膨大な基礎的研究が必要であるが, その中で遺伝子操作を用いた遺伝子レベルの研究が, 今後最も期待される研究分野であると考えられる。

光合成細菌における遺伝子レベルの研究は, 光合成と窒素固定に関するものが多く, しかも, 光合成細菌の遺伝子を大腸菌にクローニングし解析しているものが大部分であり, 光合成細菌を宿主として遺伝子の発現を研究している例は極めて少ない。その理由のひとつは, 光合成細菌において良い宿主—ベクター系が確立していないことがあげられる。光合成細菌における遺伝子導入の方法は, Wall らが発見した *Rb. capsulatus* においてのみ使用できる Gene Transfer Agent (GTA)¹⁶⁾, Fornari らが報告している *Rb. sphaeroides* における広宿主域性プラスミドを用いた形質転換系⁴⁾, *Rb. capsulatus* における広宿主域性プラスミドを用いた接合による形質転換

系^{3,8)}、松永らの海洋性光合成細菌と大腸菌におけるシャトルベクター¹⁵⁾などが知られている。しかし、適用できる光合成細菌が限定されること、形質転換効率が低いことなど改良すべき多くの問題点を残している。筆者らは、将来の利用性を考慮して菌体外酵素生産性の優れた *Rc. gelatinosus* における宿主—ベクター系の構築を試みている。筆者らの研究室保存の光合成細菌からプラスミドの検索をした結果、*Rc. gelatinosus* IL 144 から約 1.4 Kbp のプラスミド、pIL 144 を検出した。次に、選択マーカーとして利用するために *Rc. gelatinosus* APR3-2 から β -ラクタマーゼ遺伝子をクローニングした。現在、大腸菌のプラスミド、光合成細菌由来の pIL 144 および β -ラクタマーゼ遺伝子を用いて、大腸菌と *Rc. gelatinosus* におけるシャトルベクターを作成している。また、光合成細菌の分子育種のために、他の微生物由来の遺伝子を光合成細菌に導入した場合、遺伝子産物の細胞外への分泌が問題となる場合がある。Johnson らは、*Cellulomonas fimi* 由来のセルラーゼ遺伝子を *Rb. capsulatus* 由来のプロモーター領域に連結後、*Rb. capsulatus* に形質転換した結果、セルラーゼ遺伝子は発現するが細胞外への分泌されないことを報告している⁸⁾。筆者らは、*Rc. gelatinosus* における分泌ベクターに利用するために、*Rc. gelatinosus* APR 3-2 から菌体外プロテアーゼ遺伝子を大腸菌にクローニングした結果、2 種類のプロテアーゼ遺伝子を取得した⁷⁾。これらのクローニングされた遺伝子に由来するプロテアーゼは、大腸菌において細胞外に分泌生産されるが、驚くべきことに本来ペリプラズム酵素である大腸菌の β -ラクタマーゼも同時に細胞外に分泌された。この現象の解明は、大腸菌のみならず光合成細菌における酵素の菌体外分泌機構を明らかにするうえで重要な情報を与えてくれるものと期待される。以上述べたように、光合成細菌における遺伝子操作を用いた分子育種の研究は緒についたばかりであり、基礎的な遺伝子レベルの研究の集積が待たれる状況であるが、近い将来、光合成細菌において遺伝子操作が自由にできるようになり、光合成、窒素固定などの基礎的研究のみならず光合成細菌の応用研究が飛躍的に発展することが期待される。

参考文献

- 1) Buranakarl, L., Fan, C., Ito, K., Izaki, K. and Takahashi, H. (1985). Agric. Biol. Chem. **49**, 3339-3341.
- 2) Buranakarl, L., Ito, K., Izaki, K. and Takahashi, H. (1988). Enzyme Microb. Technol. **10**, 173-179.
- 3) Ditta, G., Schmidhauser, T., Wakobson, E., Lu, P., Liang, X., Finlay, D.R., Guiney, D. and Helinski, D.R. (1985). Plasmid **13**, 149-153.
- 4) Fornari, C.S. and Kaplan, S. (1982). Genetic Transformation of *Rhodopseudomonas spheroides* by Plasmid, 152, 89-97.
- 5) Gest, H. and Kamen, M.D. (1949). Science **109**, 558-559.
- 6) Hillmer, P. and Gest, H. (1977). J. Bacteriol. **129**, 724-731.
- 7) Ito, K., Sakakibara, S. and Izaki, K. (1989). Current Microbiology **18**, 41-45.
- 8) Johnson, J.A., Raymond Wong, W.K. and Thomas Beatty, J. (1986). J. Bacteriol. **167**, 604-610.
- 9) Kim, J.S., Ito, K. and Takahashi, H. (1980). Agric. Biol. Chem. **44**, 827-833.
- 10) Kim, J.S., Ito, K. and Takahashi, H. (1981). J. Ferment. Technol. **59**, 185-190.
- 11) Kim, J.S., Ito, K. and Takahashi, H. (1982). Agric. Biol. Chem. **46**, 937-941.
- 12) Kim, J.S., Yamauchi, H., Ito, K. and Takahashi, H. (1982). Agric. Biol. Chem. **46**, 1469-1474.
- 13) Kim, J.S., Ito, K., Izaki, K. and Takahashi, H. (1987). Agric. Biol. Chem. **51**, 1173-1174.
- 14) Kim, J.S., Ito, K., Izaki, K. and Takahashi, H. (1987). Agric. Biol. Chem. **51**, 2591-2593.
- 15) Matunaga, T., Matunaga, N., Tsubaki, K. and Tanaka, T. (1986). J. Bacteriol. **168**, 460-463.
- 16) Wall, J.D., Weaver, P.F. and Gest, H. (1975). Arch. Microbiol. **105**, 217.
- 17) Watanabe, K., Kim, J.S., Ito, K., Buranakarl, L., Kampee, T. and Takahashi, H. (1981). Agric. Biol. Chem. **45**, 217-222.

真性粘菌と光

上 田 哲 男

1. はじめに

判断あるいは知覚する能力は高等動物の神経ネットワークあるいは脳に高度に発達しているが、単細胞生物も外部情報を受容し、判断し、行動しており、自律的な情報処理能力は生物界に広くみられると言える。ここでは真性粘菌の光応答（走光性）を例にとりて、細胞内情報処理のしくみを述べる。粘菌変形体は多核でアメーバ運動をする巨大な原形質の塊である。この特徴を生かして他の材料では不可能あるいは困難な実験を考案し、生物情報処理を物理的・化学的に解明して行く¹⁾。

2. アメーバ運動は振動的である^{6,7)}

アメーバ型細胞は移動運動に伴って形状を変える。*Amoeba proteus* がペトリ皿の上を自由に動いているときの様子を Fig. 1 に示す。細胞は細長く伸びたような形状の時速く移動し、丸まった形状をとると停止する。このような形状変化が周期的に起こる。偽足を出す方向は確率的で、したがって移動の軌跡はブラウン運動のそれとなる。細胞形状を、例えば複雑度＝周辺長×周辺長/面積で定量化すると、周期的に変動しており、さらにスペクトル解析すると数分周期の振動成分が優勢であることがわかる。

白血球、フィブロブラスト、細胞性粘菌、真性粘菌アメーバおよび変形体などのアメーバ型細胞に対し同様な解析を行ったところ、すべて移動は

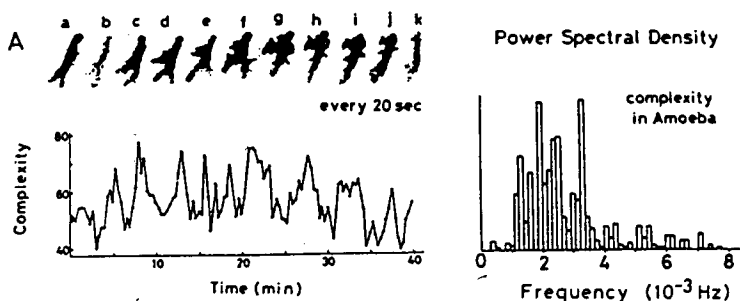


Fig. 1 Temporal order in the locomotion of *Amoeba proteus*. (Ueda and Kobatake, 1983)

振動的であった。このような普遍性から、自励振動が細胞行動において重要な役割を果たしていることが推測される。

3. 運動リズムに伴って細胞内化学成分は振動する^{4,8)}

粘菌変形体は巨大であるばかりでなく、ある条件下では先端部が同調して振動している。したがって振動に影響を与えないように少量ずつある時間間隔で先端部を切り取って行き、小片原形質の化学分析を行うと、細胞内成分の時間的変化を知ることができる。Fig. 2 に収縮リズムに伴う NADH とサイクリック AMP 濃度の変動を示す。いずれも収縮リズムと同じ周期で振動しているが、NADH は周期の約 1/3 位相が進み、サイクリック AMP は約 1/3 だけ位相が遅れているのがわかる。AMP, Ca^{2+} , あ

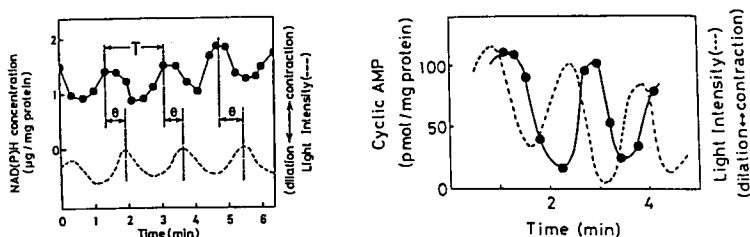


Fig. 2 Oscillations in NAD(P)H and cAMP concentration accompanying the rhythmic contraction in the plasmodia. (Mori *et al.*, 1987; Ueda *et al.*, 1986)

るいは pH も振動していることが知られている。つまり代謝振動が収縮リズムの基礎になっていると考えられる。

振動は多重周期性を示す。粘菌を低温あるいは嫌気的条件下にさらすと、周期が約 30 分という長周期の振動が現れる。あるいはアルコール刺激すると周期が数分の速い振動と遅い振動が重なり合った 2 重周期の振動が見られる。このように細胞は外的状況に応じて豊富な動的状態をとる。

4. 細胞内 ATP 濃度は行動に応じていろいろな空間分布をとる^{5,9,11)}

ATP 濃度の空間分布は粘菌のいろいろな形状に応じて変わる。粘菌は細い隙間を出ると半円状に広がるが、このとき ATP 濃度はうねりを伴った前部で高い分布を取る。細い隙間を通り抜けようとしているときは、前端部の ATP 濃度はかなり高くなっている。周囲を全部壁で囲まれると、細かい網目が全体に広がるが、ATP はうねった分布をしている。

一方向に移動している粘菌では、ATP は前端部で高く後部に行くにつれて低くなるという極性のある分布をとる。前部を忌避刺激である青色光で局所的に刺激すると、最初は刺激部位近傍の ATP 分布が乱れるが、しばらくするとこの乱れは細胞全体に伝わり、ATP 分布はきわめて凹凸の激しい波状に変わる (Fig. 3)。このとき粘菌の移動は停止し、後退し始めて

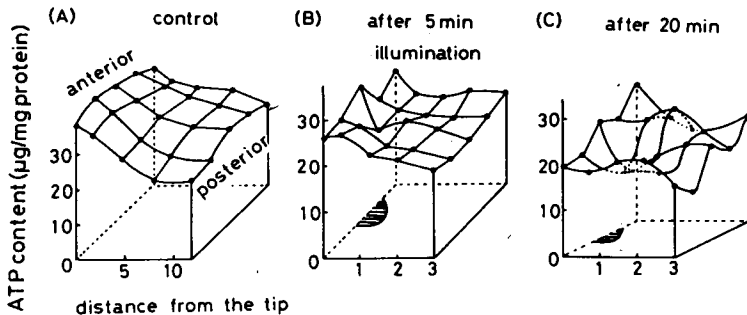


Fig. 3 Changes in ATP patterns upon local stimulation with blue light. Illuminated regions are shown by shaded areas. (Mori *et al.*, 1986)

いる。

一方向に移動している粘菌に、均一に Phe, Arg, Gly などのアミノ酸を与えると移動が抑制される。この時 ATP は凹凸の激しい空間分布をとる。

5. 化学パターンの自己秩序化が細胞行動を引き起こすという考え⁹⁾

化学反応系が強い非平衡状態におかれると、振動が現れたり、あるいは拡散により空間的にカップルするとパターンが現れることが、理論的にも実験的にも明らかにされてきている。上に述べた例えば ATP の時間空間パターンは、このようなメカニズムで自己形成されたと考えることができる。もし細胞骨格系を調節するような化学物質がさまざまな空間分布をとれば、これに従って運動や行動が誘発されることになる。アメーバ運動をこのように考えると、なぜ細胞が統一のとれた全体として振舞うかが自然に理解される。なぜなら境界条件や反応速度定数に応じて形成されるさまざまな化学パターンそのものが全体的な秩序であるからである。

6. 光逃避行動に伴うスーパーオキシド、サイクリックヌクレオチド、細胞骨格系の変動^{10,12)}

粘菌変形体はシート状に広がった原形質であるから、透過光で観測したときの明暗は原形質の厚みに対応する。行動に影響を与えない赤外光で観測しながら局所的に光を照射すると、原形質は刺激部位から逃げだして刺激部位は明るくなっていく。この方法で逃避行動を定量し、作用スペクトルを決定した (Fig. 4)。約 260 nm の遠紫外部に強い応答が見られ、また 370 nm, 460 nm の近紫外、青色光も有効である。

光刺激に伴う細胞内でのスーパーオキシドの生成をスピントラップ法で定量し作用スペクトルを決定したところ、光逃避行動のそれとよく一致した。スーパーオキシドは細胞傷害を引き起こすことがよく知られているが、この結果はアラーム・シグナルとして機能していることを示唆している。

細胞内サイクリックヌクレオチド濃度は光刺激により振動的に増加し

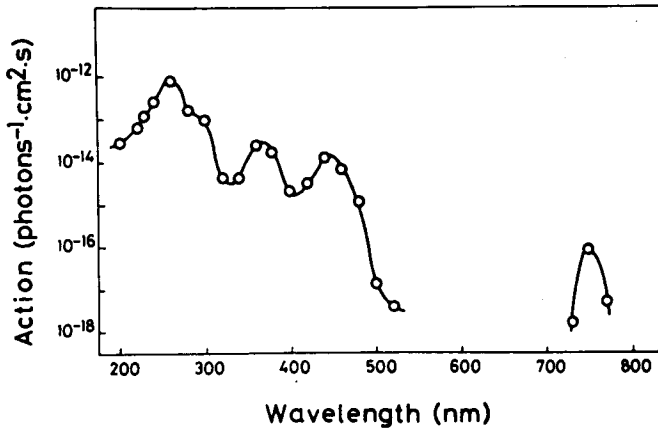


Fig. 4 An action spectrum for the photoavoidance by *Physarum* plasmodia. The action ($=1/\text{threshold}$) in logarithmic scale is plotted as a function of wavelength. (Ueda *et al.*, 1988)

た。遠紫外、近紫外、青色光に対し変動の様子が異なり、したがって各波長により異なる情報伝達の可能性が考えられる。

平たくした粘菌を偏光顕微鏡で観察すると、細胞骨格系（アクトミオシン系であることが知られている）が複屈折繊維として認められる。UV 照射により複屈折繊維は細胞全体に渡り多くかつ太くなった。また糸状の変形体を切り出すと張力が測定できるが、UV 照射によって強い張力発生がみられた。

以上の結果から光逃避行動の簡単なメカニズムがわかる。つまり局所的な光照射によりその部位が収縮し、ゾル状の原形質が他の部位へ押しやられるわけである。しかしこの考えでは、細胞内の情報交換のメカニズムあるいは細胞応答の全体性維持のメカニズムは理解できない。収縮性の制御は局所的な情報で事足りるからである。先に振動がアメーバ細胞の行動に普遍的であることを述べた。以下に振動の役割を全体情報との関連で考察する。

7. 粘菌は振動子の集団である

2次元状に広がった粘菌を透過光で観測すると、粘菌の各点はほぼ同じ

周期で振動している。しかし位相は各位置により異なる。コンピュータ画像処理により振動の振幅を濃淡パターンで表すと、振動子の集団的振舞いを解析することができる。つまり細胞の行動発現を、振動子システムにおける全体的な秩序形成として眺めることができる。

8. 局所刺激に伴う位相波の伝播と行動発現²⁾

細胞は常に振動状態にある。刺激を受けないで同心円状に広がっている粘菌では、通常周辺部と内部の位相は逆になっており、周辺から内部へ位相波が伝播している。局所的な刺激により新たな位相波の伝播が誘発される。

UV、青色光、低温、高濃度の塩などの忌避刺激では、位相波は刺激部位へ向かって伝播し、逆にオートミール、高温、グルコースなどの誘引刺激では、位相波は刺激部位から外へ流れ出る (Fig. 5)。つまり誘引・忌避という判断と位相関係が対応していることがわかった。

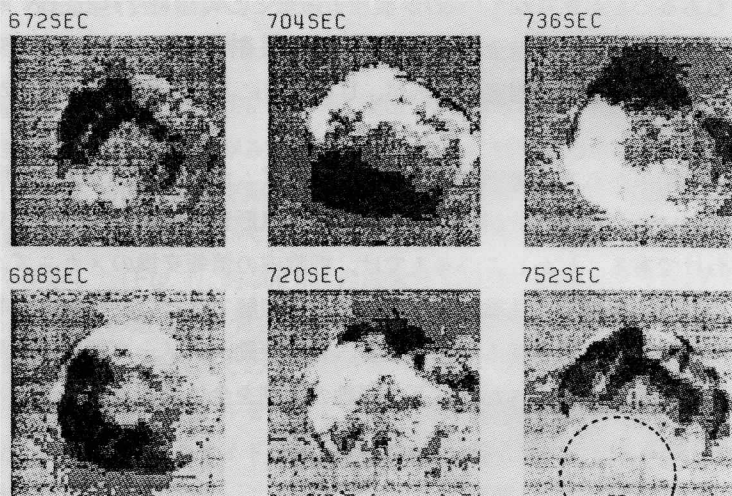


Fig. 5 Oscillation patterns after stimulation with blue light. The stimulated region is shown by dotted lines in the last picture. (More *et al.*, 1986)

9. 位相関係の人工的改変による好き嫌いの判断のコントロール³⁾

それでは人工的に位相関係を変えると、行動は変わるのだろうか。刺激を振動的に行うと、自励振動子がこれに引き込まれるという性質を利用して振動位相を改変することができる。

高温は定常刺激では誘引行動を引き起こした。しかし粘菌の固有振動よりすこし遅い振動で刺激すると、刺激部位での位相は遅れる。そして粘菌は刺激部位から逃避しようとする。

逆に低温刺激でも、少し速く振動させると刺激部位での位相を進めることができる。このとき、粘菌は刺激部位に寄っていく。以上のような好き嫌いの逆転は引き込みが起こっている限りみられた。

このように、粘菌は自ら位相の勾配を作りだして行動している。おそらく化学物質のレベルではいろいろな化学成分が複雑に変動しているであろうが、振動子のレベルでは情報の統合が行われ、お互いの関係が簡単になったと考えられる。情報処理の階層性を解く鍵がこの辺りにあるようだ。

10. 振動子集団の情報理論的解析

一方向に移動している粘菌では位相は横方向に一定であるが、前後の一次元系として取り扱える。各点の時系列を符号化し、シャノンの相互情報量を算出し、情報地図を作成した。

速く移動しているときは、細胞全体にわたり相関がみられ情報は前部なかほどから湧き出し前後に伝わっていく。誘引物質であるオートミールを前端部に置くと移動が抑制される。このとき前部の情報は後部に伝わらず、また後部は前部と相関していないことがわかった。移動速度と相互情報量との間にはよい相関があることがわかった。つまりアメーバ細胞の移動速度は、集団の秩序パラメータになっている可能性が示唆される。このように、高次の細胞機能は必ずしも一個の分子の性質に帰着されるものではなく、集団の性質として捉えなければならない。分子生態学的アプローチが不可欠であろう。

11. 今後の課題

光の受容から行動発現にいたる化学反応連鎖の解明, 微小光束の応用など課題は多いけれども, 粘菌の特徴を生かしておもしろい生理学的研究ができそうなことがわかってきた。ところが, 光応答の遺伝学的研究は皆無である。これを機会に, 変異株の分離に取り組んで行きたい。

12. 謝辞

基礎生物学研究所の大型スペクトログラフの共同利用を通じて走光性の研究を進めることができた。特に渡辺正勝博士の助言, 励まし, 寛容さに感謝します。

また恩師であり長く共同研究者であった小島陽之助教授が1988年10月31日に急逝されました。故人の御冥福を祈ります。

参考文献

- 1) Kobatake, Y., Ueda, T. and Matsumoto, K. (1989). Phase wave and perception of amoeboid cells. Symposium on "Molecular Electronics-Biosensors and Biocomputers" July 19-22, 1988, Santa Clara, CA. ed. F.T. Hog. Plenum Press.
- 2) Matsumoto, K., Ueda, T. and Kobatake, Y. (1988). J. Theor. Biol. **131**, 175-182.
- 3) ibid. (1986). J. Theor. Biol. **122**, 339-345.
- 4) Mori, Y., Ueda, T. and Kobatake, Y. (1987). Protoplasma **139**, 141-144.
- 5) Mori, Y., Matsumoto, K., Ueda, T. and Kobatake, Y. (1986). Protoplasma **135**, 31-37.
- 6) Satoh, H., Ueda, T. and Kobatake, Y. (1985). Exp. Cell Res. **156**, 79-90.
- 7) Ueda, T. and Kobatake, Y. (1983). Exp. Cell Res. **147**, 466-471.
- 8) Ueda, T., Matsumoto, K., Akitaya, T. and Kobatake, Y. (1986). Exp. Cell Res. **162**, 486-494.
- 9) Ueda, T., Mori, Y. and Kobatake, Y. (1987). Exp. Cell Res. **169**, 191-201.
- 10) Ueda, T., Mori, Y., Nakagaki, T. and Kobatake, Y. (1988). Photochem. Photobiol. **47**, 271-275.
- 11) Ueda, T., Nakagaki, T. and Kobatake, Y. (1988). Protoplasma
- 12) Ueda, T., Mori, Y., Nakagaki, T. and Kobatake, Y. (1988). Photochem. Photobiol. **48**, 705-710.

細胞性粘菌と光

前 田 靖 男

細胞性粘菌は発生学的にも系統学的にもきわめて興味深い性質を示す生物であって、生活環のなかに動物的な相(phase)と植物的な相が存在する。無性的なプロセスで形成される子実体(sorocarp)は球状の孢子群(sorus)とそれを支える柄(stalk)からなる。孢子は適当な条件下で発芽して粘菌アメーバになり、周囲のバクテリアを摂食しながら2分裂法によって増殖する(生長期)。餌としてのバクテリアがなくなると、細胞はやがて培地上の集合中心(aggregation center)細胞から分泌される走化性物質に誘引され、その方向に集まる(集合期)。その結果、数万から数十万の細胞からなる多細胞体制が構築される。この多細胞体の頂端部にはやがて乳頭突起(tip)が形成され、それは細長くなって指状の形をした集合体になる。この集合体は培地上に横たわり、ナメクジ状の細胞集団(移動体)として極性運動を行う(移動期)。移動体は粘液性の薄い膜(粘液鞘, slime sheath)でおおわれており、移動体はその粘液鞘を周囲に分泌しながらそのなかを移動する。この時期までの細胞および細胞集団の挙動はまさに動物的だといえる。しかし、移動体に上方から光を照射すると、それまでの水平方向の極性運動をやめ、細胞壁形成を伴う子実体形成期に入る。最終的に形成される子実体は形態的には植物であり、細胞型としては先述したように孢子と柄細胞から構成されている。このような生活環に見られる大きな特徴は、生長期と形態形成期とが時間的に明瞭に分離しており、また細胞分化の結果つくられる細胞型の種類がきわめて少ない点にある。したがって、この

生物は多細胞生物一般に見られる複雑な発生・分化系に比して単純であり、一つの研究モデル系として形態形成、細胞分化、および増殖の制御機構の解析に適しているといえる。

粘菌 *Dictyostelium discoideum* の移動体のごくわずかな光、たとえば発光バクテリアの放つ光に反応してその方向に向かうという事実はかなり古くから知られていた。その後の研究によってこの走光性 (phototaxis) の作用スペクトルが明らかにされ、青色光 (波長 439 nm) と緑色光 (波長 550-590 nm) が有効であることが見い出された。移動体のように、比較的透明でしかも曲面をもつ組織体に平行光線が照射された際、この組織体はあたかもレンズのようにふるまい、光は照射面の反対側に焦点を結ぶと考えられる。このような現象は“レンズ効果”と呼ばれ、屈光性との関係でフィコミセス (*Phycomyces*) において最初に報告された。現在では、いくつかの生物に見られる走光性あるいは屈光性の多くはレンズ効果によって説明されている。移動体組織に近い屈折率を示す流動パラフィン中では移動体は負の走光性を示す。また、移動体の一方の側面だけに上方からスポット光を照射すると、移動体は常に光線から遠ざかろうとする。これらの事実は、移動体の走光性がレンズ効果によることを示している。移動体側面のいろいろな部域に上方から微小スポット光を照射した実験結果によると、光を感知する部域は移動体先端部 (前から 1/10 の部域) に局在しており、他の部分は光感受性を示さない。以上のことから、光照射された移動体は未照射の移動体よりも速やかに移動運動ができると考えられ、事実、移動体の移動速度は光照射によって約 75% 増加することが示されている。

波長 560 nm の緑色光を移動体に照射すると、ある光感受性色素の 411 nm での吸収 ($\Delta E_{411} - \Delta E_{428}$) が急激に増加し、この吸収変化は照射終了後約 7 秒の半減期をもって減衰する。この反応は無細胞系 (*in vitro*) でも進行し、ミトコンドリア画分でのみ起る。上記の光感受性色素は分子量 24 万ダルトンのヘムタンパク質であって、適当な光照射条件下で可逆的な光酸化 (photo-oxidation) を行なう。光酸化の作用スペクトルおよび光感受性色素の吸収スペクトルは双方とも移動体走光性の作用スペクトルに類似している。したがって、この色素は移動体の光応答に必須の光感受性色素

である可能性が強く、フォトタクシン (phototaxin) と呼ばれている。

以上のような知見から、走光性のしくみに関して次のような仮説が提唱されている。すなわち、平行光線は移動体のレンズ効果によって照射面の反対側に位置する細胞に収束され、そこに存在するフォトタクシンによって効率的に吸収される。次いで、フォトタクシンの光酸化を介してその領域での細胞の移動速度が高まり、その結果、移動体は光の方向へ方向転換する。この仮説に関しては今後さらに細部にわたった検討を要し、特にフォトタクシンがどのような機構によって細胞運動に関与しているかを細胞および分子のレベルで明らかにする必要がある。

細胞集合のプロセスに光が関係する例もある。*Polysphondylium* 属の集合期細胞はグロリン (glorin) と呼ばれるジペプチドへの走化的指向運動によって集合し、多細胞集団を形成するが、この集合に先立って細胞ポピュレーションのなかに特殊な細胞 (円形の細胞) が出現する。この細胞は創始細胞 (founder cell) といわれ、グロリンを自律的に合成・分泌する集合中心細胞として機能する。創始細胞は 100 細胞あたり約 1 個の割合で出現し、これをマイクロビーム等で殺すと、周囲にいる細胞が新たに創始細胞になる。このように、創始細胞の分化は可逆的でポピュレーションのなかで調節されているが、実はこの創始細胞の出現は光によって制御されている。すなわち、創始細胞の分化には光照射が必須の条件であり、暗黒下では創始細胞は出現せず、したがって細胞集合できない。このような顕著な細胞が明瞭な光制御下にあることはきわめて興味深い事実であるが、どのような光がいかなるプロセスを介して創始細胞の分化を可能にしているかは今後の重要な研究課題である。

ところで、上述の事柄は子実体形成過程という無性生殖のプロセスで起こることであり、細胞性粘菌のいくつかの種には有性生殖過程としてマクロシスト (macrocyt) 形成をするものがある。すなわち、1) 細胞塊内での 2 つの細胞の融合と核融合による接合子 (zygote) の形成、2) 接合子による周囲の細胞の摂食・消化とそれに伴う接合子の巨大化、および 3) 厚い細胞壁でおおわれた巨大単一細胞 (マクロシスト) の成熟、という一連のプロセスを経てマクロシストが形成される。細胞が無性生殖 (子実体形成)

に進むか有性生殖（マクロシスト形成）に向かうかというような発生経路の選択は、光、水分条件、揮発性物質であるエチレンの有無等の環境要因によって左右され、光照射はマクロシスト形成に阻害的にはたらく。光がマクロシスト形成を阻害する機構は現在のところ全く不明であるが、光阻害を受けない変異種も分離されているので、両者の比較検討を通じての今後の解析が期待される。

従来、マクロシストの発芽が非常に困難であったがため、この系を用いての遺伝的解析はあまり進んでいなかった。発芽の誘導条件について調べた最近の研究によると、青色—近紫外色がマクロシストの発芽誘導に有効であり、最適条件下では高率（約 80%）の発芽率が得られることがわかった。これによってこの有性生殖過程を活用した将来の遺伝的解析が容易になったといえる。なお、マクロシストの発芽誘導には必ずしも長時間の光照射は必要ではなく、ある光強度以上では数秒の照射で充分であることが示されている。また、光誘導発芽は弱光のもとでは完全に光照射量に依存しており、このことは発芽には純粋な光化学反応が介在していることを示唆している。発芽の作用スペクトルに関しては現在調査中である。

以上に述べたように、光は細胞性粘菌の発生・分化のさまざまな局面に深く関係している。しかし、光の作用機作に関して明らかになっていることは今のところほとんどなく、それだけに今後の研究に期待するものが大きいと言える。他の生物における光作用との関連を探る上でも細胞性粘菌を対象とする研究は重要かつ興味深いテーマになると考える。

接合菌類と光

大 瀧 保

1. はじめに

接合菌類ではヒゲカビ (*Phycomyces*) やミズタマカビ (*Pilobolus*) などが古くから光反応の研究に使用されている。特にヒゲカビは、 1 nW/m^2 ~ 10 W/m^2 までの広い範囲の光に感受性を持ち、多くの成長行動や形態形成、そして代謝が制御されている (表 1)。ここでは、ヒゲカビを中心に、突然変異株を利用した光反応の解析について述べたいと思う。

2. 突然変異株とその形質

ヒゲカビでは種々の種類の突然変異株がこれまでに多数単離されており、このカビの光反応系の各過程の解明に利用されている (図 1)。その代表的な突然変異株およびその特徴は次の様である。

(1) **β -カロチン合成変異株**: ヒゲカビの菌糸や胞子嚢柄は多量の β -カロチンを含むが、これまで脱水素酵素欠損によるフィトエン蓄積型の白色変異株 (*car B*)、cyclase 酵素が欠損したリコペン蓄積型の赤色変異株 (*car R*)、カロチン合成調節機構に変異の起こったと考えられる白色変異株 (*car A*) および β -カロチン合成過剰変異株 (*car S*)、そしてこれらの変異が二重あるいは三重に起こった変異株も得られている¹⁾。

(2) **β -カロチン光誘導合成変異株**: ヒゲカビの β -カロチン合成は暗所でもある程度合成されるが、光照射によってさらにその合成が促進され

表1 ヒゲカビ (*Phycomyces*) にみられる光反応CAROTENOGENESIS β -carotene +

Enzyme Activity +

PHOROGENESIS

Macrophores +

Microphores -

Sporangium +

GROWTH RESPONSE

Mycelial Growth + (?)

Light-Growth Response +

Dark-Growth Response -

PHOTOTROPISMWild-Type { Visible Light positive
 { Ultraviolet negativepil Mutant negativecarS Mutant negativeMECHANICAL EXTENSIBILITY

Extensibility of Spph +

METABOLISM

{ Chitin Synthetase +

{ Chitinase +

Alcohol Dehydrogenase -

Cyclic AMP -

Phosphodiesterase +

CO₂ Fixation to Oxalacetate +

{ Oxalacetic Acid +

{ Citric Acid - (?)

{ Malic Acid -

{ Asparagine +

{ Aspartic Acid +

{ Glutamic Acid +

MATING

Trisporic Acid Synthesis -

Zygospore Formation -

+ : 促進効果, - : 抑制効果

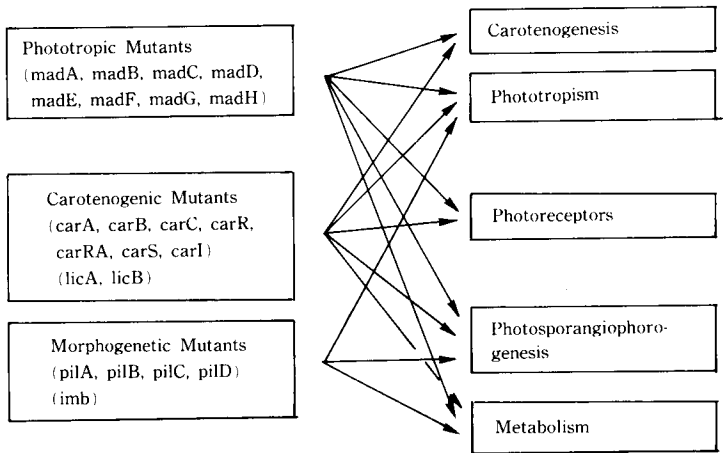


図1 ヒゲカビの突然変異株とそれを利用した研究課題

る。しかし、この変異株では光による合成促進効果は見られず、したがって含まれるカロチンの量は暗所培養のものと同じである（遺伝子型 *pic*）。この場合、光によって促進を受けるのは β -カロチン合成系路のごく初期の段階であるため、上記 *car B* および *car R* 変異株においても、それぞれフィトエンやリコペンの合成は光照射によって促進される¹⁾。

(3) **光屈性異常変異株**：ヒゲカビの孢子囊柄 (macrophores) は一方から入射する青色光に対しては正の屈性を示す。このカビでは、これまで光屈性異常変異株が多数得られており（遺伝子型 *mad*）、相補性テストや交雑実験から8個の遺伝子が関与していることが明らかになっている。このうち *mad A* および *mad B* 変異株は、 β -カロチン合成の光誘導作用や後述する孢子囊柄形成の光促進作用が見られないことから、光受容体側に変異の起こったものと考えられ、また *mad C* は光受容の他にその刺激伝達の機構に、また *mad D* から *mad G* に至る変異株では光屈性だけでなく重力屈性なども示さないことから、屈曲機構そのものに異常があるものと考えられている。*mad H* 変異株では光感受域は変わらないものの、光強度の非常に弱いからあるいは非常に強い、いわゆる閾値付近の光強度に対しても野生株より大きな角度で屈曲する変異株である。これら *mad A* から

mad G に至る変異株では、しかしながら、屈曲を示さないのは弱い光に対してであり、 $10 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ 以上の強い光に対しては正常な屈曲反応を示す。二重あるいは三重の *mad* 変異株も得られており、これらはいずれも屈曲に対する光感受性はより鈍くなるが、これまで完全に光に対して感受性を示さないような変異株は得られていない²⁾。

(4) **成長域肥大型突然変異株**：この形態的変異株では孢子囊柄の成長域が孢子囊形成後、しだいに肥大成長し、伸長成長を停止する（遺伝子型 *pil*）。伸長成長を行っている野生株孢子囊柄では上方から観て時計方向に回転しているが、伸長成長から肥大成長に転じた *pil* 変異株では、反時計方向に回転を逆転する。また、成長域の直径が $200 \mu\text{m}$ 以上にも肥大すると、孢子囊柄は一方から入射する光に対して負に屈曲を行うようになる⁴⁾。

(5) **孢子囊柄形成光制御異常変異株**：ヒゲカビは菌糸上に二種類の孢子囊柄を分化する。すなわち、直径約 $150 \mu\text{m}$ で 10 cm 以上にも伸長し、光屈性などの研究に使用されている *macrophores* と、直径約 $10 \mu\text{m}$ で長さ 1 mm 程度の *microphores* である。*macrophores* は密閉した容器内や低窒素培地上では、より光の制御を受けるようになり、その形成は青色光によって促進される。一方、*microphores* は暗培養された菌糸上にのみ分化し、光照射によってその形成は完全に抑制される。突然変異株 *imb* はこのような孢子囊柄形成異常変異株である³⁾。

3. 突然変異株による光反応の解析

上記の種々の突然変異株は、これまでこのカビの光反応の解析に大きな役割を演じてきた(図 1)。ヒゲカビの光受容体に関しては、これまで β -カロチン説とリボフラビン説が主張されてきた⁶⁾。二重、三重にブロックされほとんど β -カロチンを合成しない白色変異株でも、その孢子囊柄は正常な光屈性を示すことから、少なくとも β -カロチンはこのカビの光屈性の光受容体としては関与していないことが示唆された。一方、 β -カロチン合成変異株では孢子囊柄 (*macrophores*) の光誘導形成により大きな光強度を必要とするなどの事実から、この光反応には β -カロチンが光受容色素として関与しているとする指摘もある。 β -カロチン合成の光促進反応欠損変異株

(*pic*)には、カロチンの合成促進作用があるレチノールによって影響を受けるものと受けないものがあり、この反応の光受容機構は単純ではないことを暗示する。このような光受容機構の複雑性は、光屈性変異株 (*mad*) が弱光および強い光に対して異なった反応をすることからも示唆され、また光受容体側に変異の起こったと考えられる *mad A*, *mad B*, *mad C* 変異株の光屈性に対する作用曲線がいずれも異なった様相を呈することからも示唆された⁶⁾。

ヒゲカビの光屈性は最も解析の進んでいる現象であるが、その解析には、上述した *car* 変異株や *mad* 変異株、それに成長域の肥大する *pil* 変異株が大きな役割を演じた。多くの *mad* 変異株を表現型や遺伝子型の違いから分類すると、上述したように同じ光屈性異常変異株ではありながら異なった機構上の変異であることがわかる。これは光屈性現象を解明する場合、その解析目標や方法を探る上で極めて重要な方向を与えてくれる。

ヒゲカビ野生株の胞子嚢柄は前述したように可視光線に対しては正の屈性を示し、紫外線に対しては負の屈曲を示す。成長域の肥大が $200\ \mu\text{m}$ 以上にまで達した *pil* 変異株の胞子嚢柄や、また β -カロチンを多量に含んだ β -カロチン過剰合成変異株 (*car S*) の胞子嚢柄では、可視光線に対しても負の屈曲が起こると言う事実は、このカビの胞子嚢柄の正負屈曲の方向決定の機作を知る上で、多くの示唆を与えてくれ、我々は胞子嚢柄細胞の光源側と反光源側における最大光強度の比によって、胞子嚢柄の屈曲の方向が決定されるという仮説をたてた⁵⁾。すなわち、光源側の細胞表面上での最大光強度よりも、レンズ効果によって反光源側に集中した最大光強度の方が大きい場合には胞子嚢柄は正の屈性を示すが、成長域の肥大や β -カロチンの存在によって反光源側に達する光が減少すると、光源側の方の最大光強度の方が反光源側のそれより上回り、胞子嚢柄は負に屈曲するようになるというものである。この考えは UV 光に対する負の屈性にも適用でき、UV 光を吸収する没食子酸が胞子嚢柄細胞内に多量に存在する事実によって説明される。

胞子嚢柄形成欠損変異株 (*imb*) は、このカビの胞子嚢柄形成に対する光作用の機作を解析する上で役に立つと思われる。現在のところ得られてい

る *imb* 変異株は、与えられた光条件とは無関係に全く胞子囊柄を形成しないものが多いが、将来 microphores の形成が光で抑制されないような変異株も得られれば解析はさらに進展するものと思われる。

4. おわりに

以上、ヒゲカビの代表的な突然変異株と、それらを用いた光反応解析の例を述べた。前述したように、屈性や形態形成など我々が巨視的に観ているものは、「刺激受容 — 伝達 — 反応発現」系の長い連鎖反応の末端現象である。したがって、このような長い反応過程の各素過程でブロックされているような突然変異株が分離されれば、生化学的な合成系路がそれによって解明されたように、光形態形成や光によって誘起される行動もさらに詳細に、また精密に解析できようになるものと考えられる。

参考文献

- 1) Cerdá-Olmedo, E. (1987). Carotene. in *Phycomyces* (Cerdá-Olmedo, E. and Lipson, E.D. eds.), pp. 199-222, Cold Spring Harbor Lab., New York.
- 2) Galland, P. and Lipson, E.D.. (1987). Light physiology of *Phycomyces* sporangiophores. in *Phycomyces* (Cerdá-Olmedo, E. and Lipson, E.D. eds.), pp. 49-92, Cold Spring Harbor Lab., New York.
- 3) Galland, P. and Ootaki, T. (1987). Differentiation and Cytology. in *Phycomyces* (Cerdá-Olmedo, E. and Lipson, E.D. eds.), pp. 281-316, Cold Spring Harbor Lab., New York.
- 4) Koga, K., Sato, T. and Ootaki, T., (1984). *Planta* **162**, 97-103.
- 5) Ootaki, T., Koga, K., Oosawa, S., Okazaki, R., and Tsuru, T. (1988). *Exp. Mycol.* **12**, 313-324.
- 6) Presti, D.E. and Galland, P. (1987). Photoreceptor biology of *Phycomyces*, in *Phycomyces* (Cerdá-Olmedo, E. and Lipson, E.D. eds.) pp. 93-126, Cold Spring Harbor Lab., New York.

子のう菌，不完全菌類と光

熊 谷 忠

このワークショップを開催するにあたって今回は第1回目でもあるし、いろいろな研究者との情報交換にウエイトを置き、啓蒙的な性格を持たせようという意図がありました。又、コンバーナーからは光受容体について言及せよとの注文がありました。そういうわけで、私の話題のひとつは、いろいろな光生理現象とそれらの作用スペクトルを紹介することにある。もうひとつは、ここ約10年の間、“青色光による光調節反応”の光受容体としてある種のフラビン分子が機能する可能性が大であるという積極的な考えが出されているので、それらを紹介することにします。

ある種の光合成細菌や藍藻が地球上に出現したのは今から約32年億年も前であったといわれる。それよりもはるかに長い間、毎日、一定の昼と夜の周期の下で、又、年から年毎に繰り返される規則正しい周期の下で生活を営んできた生物（しかも、生物細胞を構成している全ての物質はそれぞれ固有の波長の電磁波を吸収するわけであるから）は自からを取り巻く光環境に絶えず適応しながら進化してきた。従って、全ての生物は、積極的であれ消極的であれ、なんらかの形で太陽光と縁があるはずであるし、植物の行なう光合成なしには生存できない。緑化植物の発生や分化の様式がフィトクロムを介する光反応によって調節される光形態形成は比較的良好に知られている。“信号”として働く、もうひとつの低エネルギーの光反応である“青色光”によって調節される光形態形成や光運動になると、生物学者には比較的良好に知られるようになってきてはいるが、巷間での認識は今一

歩である。一方、クロロフィルを持たない菌類の生活は、いろいろな発育段階でいろいろと近紫外光か青色光、あるいはその両方によって調節されるが、巷間での認識は稀薄である。実際には、“菌類の生活と光”に関する研究は19世紀の後半から純科学的な立場から行なわれてきたし、また、キノコの生産、農薬に代わる植物病害防除など実生活の面でも関心が持たれている。私共は、最初、フィトクロムはクロロフィルを持たない下等生物には存在しないのであろうかという疑問から始まり、光環境に対する生物の適応の様式、生活環の制御あるいは光形態形成を調節する光反応の機構を知りたくてこの分野に足をつっ込んできた。現在、基礎と応用の両側面からの研究が重要であると私は思っている。

子のう菌、不完全菌類の光生理現象のうち孢子形成〔子のう菌は有性生殖器官である子のう殻の中に子のう孢子を形成する。成熟した子のう殻は破裂し、孢子を放出する。有性生殖が現在のところ不明である不完全菌は最初、孢子形成の前段階である分生子柄を形成し、一定の期間を経ると分生子孢子を形成する〕の光調節が広範の菌にわたって調べられている。

H.L. Barnett と V.G. Lilly (1950) は、接合菌 *Choanephora* の孢子形成過程には孢子形成を誘起するのに必要な反応系 A と、その後暗黒で進行する反応系 B〔つまり、光によって阻害される〕の2つの反応系が含まれることを示した。その後、C.M. Leach (1967) は不完全菌の孢子形成過程にも2つの光反応系が含まれることを確認し、diurnal sporulators の存在を示した。明期と暗期（光中断を受ける）の必要性は担子菌 *Coprinus*⁴³⁾ の子実体形成でも認められており、いろいろな担子菌、子のう菌がそれぞれ一日のうちの一定の期間（朝型とか真夜中型）に成熟した孢子を放出することなどを考え合わせると、光周性となんらかの類似性を物語っている。このような光反応系の有無から、不完全菌を次の3つのグループに分けることができる（子のう菌にも準用できる）。(1)：連続暗黒下では分生子柄も形成せず、菌糸のみの生長を行なう。栄養菌糸が光に出会うと分生子柄の形成が誘起され（光誘導相）、ひき続いて暗黒に置くと孢子が形成される。この暗期反応の進行は光によって阻害される（光阻害相）。(2)：分生子柄

の形成誘導にはとくに光を必要としないが，その後の暗期反応は光阻害を受ける。つまり，連続暗黒下で孢子が形成される。(3)：分生子柄の形成誘導には光を必要とするが，その後の孢子形成過程は光阻害を受けない。つまり，連続明条件下でも孢子は形成される。

図1に，いろいろな菌類に見られる光生理現象と作用スペクトルを示した。*Trichoderma* の分生孢子形成誘導(a)，*Nectria* の子のう殻形成誘導(b)をはじめいずれも，相互に多少異なるが，530 nm より短波長側の光が有効であり，360～380 nm 付近と 450 nm 付近にピークを示す。このような作用スペクトルを示す青色光による光調節反応は，表1にも示すように菌類全般に，また緑化植物全般にわたって知られている¹⁹⁾。不完全菌 *Verticillium* のカロチノロイド合成，担子菌 *Shizophyllum* の子実体形成⁵²⁾ の光誘導では，作用スペクトルのピークが 380 nm～390 nm 付近に存在し，光受容体として pteridine の可能性も示されているが，例は少ない。

一方，表2には近紫外光により調節される現象を示したが，多くが孢子形成の誘導に関するものである。これらの作用スペクトルは 330～340 nm より短波長側の光が有効であり，280～300 nm 付近にピークを示す例が多い。ただし，細胞を構成している物質はこの付近の波長の光を吸収するし，また，細胞構造体による散乱，反射などが関係してくるので解釈が難かしくなるが，作用スペクトルのピークの位置，光生理現象を誘起するのに必要な光強度などから考えて，直接，核酸が吸収する光増感作用による可能性は低い。適当な光強度の紫外線を照射すれば菌糸が死滅するのは当然である。最近，*Gelasinospora* の子のう殻形成を誘導するのに有効な光の作用スペクトルは，450 nm 付近のピークの他に 280 nm 付近にピークが存在し，両者の量子収率の比がフラビンの吸収に近いことから，280 nm 付近のピークはフラビンの紫外域での吸収ピークに依るものであると考え，フラビン分子が青色光受容体である可能性を，作用スペクトルを基にして強調している²⁰⁾。同様の知見が *Coprinus* の子実体形成でも示されている⁴⁾。*A. tomato* の菌糸からは近紫外光照射に対応して 305 nm 付近に吸光度の変化を示し，チトクローム C を光還元する物質が取り出されている。この物質の光感受性はフラビンとほぼ同様であり，好気条件ではスーパーオキシ

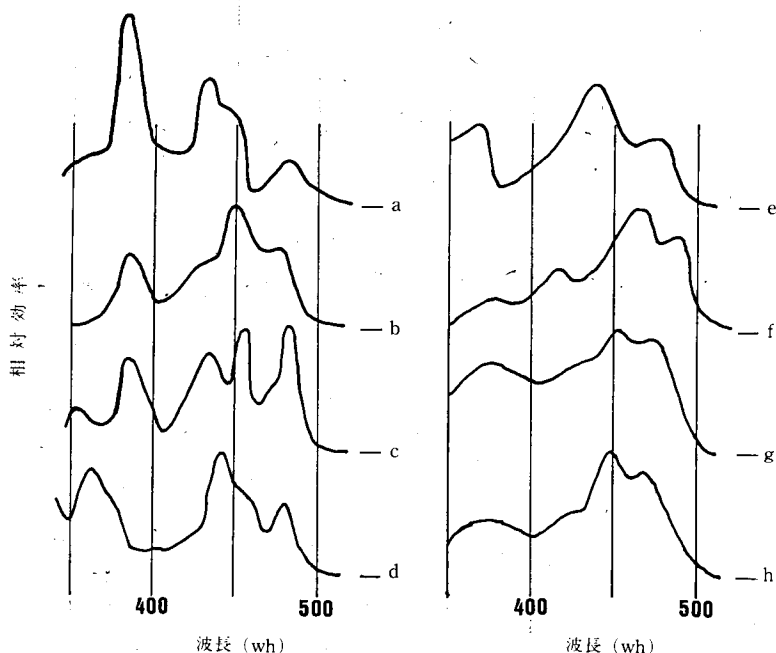


図1 いろいろな光生理現象の作用スペクトル

- a) *Trichoderma viride* の胞子形成の光誘導 (Kumagai & Oda, 1969 より)
 - b) *Alternaria tomato* における栄養菌糸からの分生子柄形成誘導効果を打ち消す光反応 (Kumagai, 1983 より)
 - c) *Alternaria solani* における分生子柄からの胞子形成を阻害する光反応 (Honda & Nemoto, 1984 より)
 - d) *Nectria haematococca* の子の殻形成の光誘導 (Cartis, 1972 より)
 - e) *Coprinus congregatus* の子実体形成の光誘導 (Durand & Furuya, 1985 より)
 - f) *Neurospora crass* のサーカディアンリズムの光阻害 (Sargent & Briggs, 1967 より)
 - g) *Fusarium aquaeductum* のカロテノイド合成の光誘導 (Rau, 1967 より)
 - h) *Phycomyces blakesleeanus* の光屈性 (Curry & Gruen, 1959 より)
- (註, 熊谷忠, カビの光受容感覚, 微生物 3, pp. 374-381, 1987 より)

ドアニオン (O_2^-) を, 嫌気条件では不明のラジカルを生成する (Kumagai, 1980)。私はこの光感受性物質が近紫外光受容体である可能性を考えているが, 精製すると不安定となり, 化学構造は不明である。

表1 青色光により調節される現象

現 象	糸 状 菌 名	文 献
光屈性	<i>Phycomyces blakesleeenanus</i> (Z) <i>Pilobolus kleini</i> (Z)	G.M. Curry & H.E. Gruen (1954) R.M. Page & G.M. Curry (1966)
胞子のう柄の光生長	<i>Phycomyces blakesleeenanus</i> (Z)	M. Delbrück & W. Shropshire, Jr. (1960)
胞子形成帯の概日性リズム	<i>Neurospora crassa</i> (A)	M.L. Sargent & W.R. Briggs (1967)
光逃避反応	<i>Physarium nudum</i> (M)	J. Bialczk (1979)
分生胞子形成誘起	<i>Trichoderma viride</i> (D)	T. Kumagai & Y. Oda (1969)
近紫外光による分生子柄形成誘起の抑制	<i>Alternaria tomato</i> (D) <i>Helminthosporium oryzae</i> (D)	T. Kumagai (1983) T. Kumagai (1983)
分生子柄からの胞子形成阻害	<i>Alternaria tomato</i> (D) <i>Alternaria solani</i> (D) <i>Stemphylium solani</i> (D)	M. Aragaki (1962) Y. Honda & T. Nemoto (1984) C.M. Leach (1968)
コレミウム形成	<i>Penicillium claviforme</i> (D)	A.G. Faraj-Salman (1971)
子のう殻形成誘起	<i>Nectria haematococca</i> (A) <i>Gelasinospora reticulispota</i> (A)	R. Curtis (1972) Y. Inoue & M. Furuya (1975)
子実体原基形成誘起	<i>Coprinus congregatus</i> (B) <i>Favolus arcularius</i> (B)	R. Durand & M. Furuya (1985) Y. Kitamoto et al. (1972)
子実体形成	<i>Favolus arcularius</i> (B) <i>Shizophyllum commune</i> (B)	Y. Kitamoto & A. Suzuki (1974) J.H. Perkins & S.A. Gordon (1969)
カロチノイド合成	<i>Fusarium aquaeductum</i> (D) <i>Mycobacterium marinum</i> (P) <i>Neurospora crassa</i> (A) <i>Verticillium agaricinum</i> (D)	W. Rau (1967) C.D. Howes & P.P. Batra (1970) M. Zalokar (1955) L.R.G. Valadon et al. (1975)
チトクロームの光還元	<i>Neurospora crassa</i> (A)	V. Munoz & W.L. Butler (1975)
硝酸還元酵素	<i>Neurospora crassa</i> (A)	E. Klemm & H. Ninnemann (1979)

P: 原核菌類, M: 変形菌類, Z: 接合菌類, A: 子のう菌類, D: 不完全菌類, B: 担子菌類を表わす。

(註, 熊谷 忠, 光はカビの生活を変える, 化学と生物, 24, pp. 20-29, 1986 より)

(1) のグループにタイプ分けされる *Helminthosporium oryzae* の一定の成熟段階にある分生子柄は, 青色光を受けると気中菌糸に脱分化し, 胞子は形成されない。青色光を受けた直後に近紫外光を受けると, 青色光による胞子形成阻害作用は打ち消され, 再び胞子が形成されるようになる。この2つの光の効果は繰り返しが可能であって, 最終的な生理的效果は最後に受けた光の質によって決定されることから青色光と近紫外光による可逆

表2 近紫外光, 紫外光により調節される現象

現 象	糸 状 菌 名	文 献
子う殻形成誘起	<i>Ascochyta pisi</i> (A) <i>Pleospora herbarum</i> (A)	C.M. Leach & E.J. Trione (1965) C.M. Leach & E.J. Trione (1966)
子う殻形成誘起と阻害	<i>Gerasiothia reticulisporea</i> (A)	Y. Inoue & M. Watanabe (1984)
胞子形成誘起	<i>Pleospora herbarum</i> (A)	C.M. Leach & E.J. Trione (1966)
分生胞子形成誘起	<i>Alternaria cichori</i> (D) <i>Alternaria dauci</i> (D) <i>Alternaria solani</i> (D) <i>Alternaria tomato</i> (D) <i>Botrytis cinerea</i> (D) <i>Helminthosporium oryzae</i> (D) <i>Stemphyllium solani</i> (D)	D.J. Vakaloonakis (1986) C.M. Leach & E.J. Trione (1966) Y. Honda & T. Yunoki (1981) T. Kumagai (1983) Y. Honda & T. Yunoki (1978) S. Yamamura et al. (1977) T. Sproston (1971)
累積子実体形成阻害	<i>Dictyostelium discoideum</i> (Ac)	M. Häder (1983)

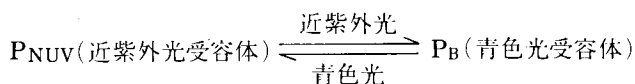
Ac: 細胞性粘菌を意味する。

(註, 熊谷 忠, 光はカビの生活を変える, 化学と生物, 34, pp. 20-29, 1986
より)

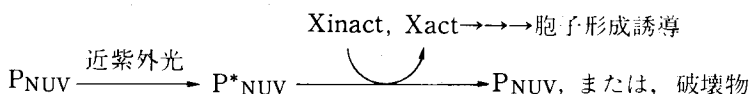
的光反応系の存在 (mycochrome 系と名付けられる) が見出された¹²⁾。同様の光制御系がその後 *A. tomato*³⁰⁾, *A. solani*¹³⁾, *A. cichori*⁵⁰⁾, *Botrytis cinerea*⁴⁷⁾ の分生子柄からの胞子形成調節において見出された。最近, *A. solani* において, この発育段階での胞子形成の光阻害の作用スペクトルが測定され, 前述したような青色域と紫外域 (280~300 nm 付近にピーク) の両方にピークが認められている¹³⁾。青色光による胞子形成阻害作用を打ち消す近紫外光の作用スペクトルは, この発育段階が分生子柄形成を誘起した後の, 暗期開始後 8~10 時間目に相当することから複雑であり, 労力を要することもあって測定されていない。しかし, 後述するような, 分生子柄形成誘導のものと類似の波長依存性を示す色素の存在が示されている。

一方, 最近, *A. tomato*²⁴⁾, *H. oryzae*²⁵⁾ において, 胞子形成の第一段階である栄養菌糸からの分生子柄形成の誘起も, 近紫外光と青色光による拮抗反応の制御下にあることが見出され, その後, *A. cichori*²⁵⁾, *A. solani* (Kumagai & Homda 未発表) においても見出されている。すなわち, 暗黒下で生育した栄養菌糸が 305 nm の近紫外光を秒~分の長さで受けると分生子柄の形成が誘起され, 誘起後暗黒に置かれると分生子柄が形成される。ひき続いて暗黒に置くと分生胞子が形成される。この近紫外光による

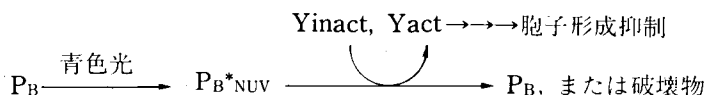
分生子柄形成の誘導効果は近紫外光照射直後に与えた青色光によって打ち消され、分生子柄はもちろん分生孢子も形成されない。この2つの光の効果は相互に打ち消し合い、繰り返しが可能である。また、種々の光強度の近紫外光と青色光を同時に照射することによって孢子形成を誘起すると、光照射時間が長くなるにつれて、一定の誘導期間の後、孢子数が増加するが、青色光の割合が多い場合には、誘導期間が長くなり、孢子数の増加も低い。一定時間の光照射によって孢子形成を誘導した場合には、最終的に形成される孢子量は、2つの光の光強度の比に依存する。近紫外光に対して青色光の割合が高いと孢子数は少ないし、青色光の割合が低いと多くなる。分生子柄形成を誘起するのに有効な光の作用スペクトルは340 nmより短波長側の光が有効であり、320 nm付近に肩を、300 nm付近にピークを示す^{51,25)}。*A. solani*^{15,49)}においては280~290 nm付近にピークが認められている。一方、近紫外光による孢子形成誘導効果を打ち消すのに有効な光の作用スペクトルは、図1の(6)に示されるように、いわゆる青色光効果と同様である。最近の知見によると²⁸⁾、分生子柄形成を誘導するための近紫外光を照射する前にあらかじめ与えておいた青色光も近紫外光による分生子柄形成誘導効果を打ち消す。同じ量の分生子柄形成を誘導するためには、前照射した青色光量が多い場合にはより多くの近紫外光量を必要とし、少ない場合には少ない近紫外光量で充分である。この近紫外光照射前に与えた孢子形成誘導効果を打ち消すのに有効な光の作用スペクトルは、近紫外光照射直後に与えた孢子形成誘導効果を打ち消すのに有効な作用スペクトルと全く同じである。暗黒下で生育した菌糸が近紫外光に遭遇すると何時でも分生子柄形成が誘起されるので、栄養菌糸には、何時でも、近紫外光受容体が含まれていることになる。一方、分生子柄形成を誘導するための近紫外光照射前後に見られた分生子柄形成誘導効果を打ち消すのに有効な作用スペクトルが同じことから、同一の青色光受容体が栄養菌糸には、何時でも、含まれていることになる。問題は、何時、光照射が与えられたかにある。以上示してきたように、孢子形成誘導時における青色光と近紫外光による可逆的光反応系は、phytochromeのように



の光変換を行なう光受容体の機能で説明するのは困難である。それよりはむしろ、次のような刺激量の差に依存すると考えた方がよい。つまり、 P_{NUV} が近紫外光照射によって励起されて P^*_{NUV} が生じ、この $^*_{\text{NUV}}$ の緩和過程のあるステップで生じた中間体と、暗黒で生成された X_{inact} が反応して孢子形成に有効な物質 X_{act} が生成される。



同様に青色光の反応によって、孢子形成阻害に作用する Y_{act} が生成される。



この2つの光反応によって生じる $[\text{X}_{\text{act}}]$ と $[\text{Y}_{\text{act}}]$ の量の差によって、形成誘導される孢子量が規定されたとすると、いろいろな現象を良く説明できる。尚、近紫外光照射、次いで青色光照射、あるいは、その逆の順で光照射する際に、両光の照射の間にいろいろの長さの暗期を挿入することによって、想定した刺激物質の寿命を推定できるが、15~30分位の長時間にわたって安定であることが判かる。あらかじめ N_2 ガスで空気を追い出して嫌気状態にした栄養菌糸に近紫外光を照射すると、好気条件に置いた対照に比べ、はるかに多く、孢子形成が誘導される。また、その直後に与えた青色光による孢子形成抑制効果もはるかに増大するので、これらの光反応は酸化還元反応による可能性が大である²⁵⁾。とくに、青色光の反応は偏光の影響を受けるので、青色光受容体は細胞内構造体の何処かに組み込まれている可能性も示されている²⁹⁾。その他、ミリ秒レベルでの間歇照射によ

る想定刺激物質生成のキネティックス, 温度反応, ある種の阻害剤などの影響についてもいくつかの情報を得ているが, 次の機会に譲る。

これまでに紹介してきた青色光による光調節反応の光受容体 (cryptochrome, あるいは blue-UV light photoreceptor) については, ここ 30 年以上にわたって, 共に 450 nm 付近に作用スペクトルのピークを示すフラボプロテインかカロチノプロテインかをめぐって論争がなされてきた。その主たる論点は 360~380 nm 付近のピークの解釈にあった (フラビンは 360~380 nm 付近にピークを示す。カロチノイドは特殊な状態でのみその付近にピークを示す)。この点に関しては, (1) カロチノイド合成阻害剤 (diphenylamine, SAN 6706 など) や光励起された色素分子の消去剤 (phenylacetic acid, KI, Xe, lyxoflavin など) の影響, (2) O_2 を含む酸化還元剤の影響 (フラビン分子の光反応は酸化還元反応と関係する), (3) カロチノイド欠損株の光感受性の検討 (親株の 4×10^{-5} 以下の β -カロチンしか含まない *Phycomyces* の変異株の光屈性反応の光感受性は親株の場合と同じであった⁴²⁾。また親株の $8 \times 10^{-4}\%$ より低いカロチノイドを含む *Neurospora* の三重欠損変異株の子のう殻形成の光誘導の 471 nm の光に対する感受性は親株と同じであった。従ってバルクのカロチノイドは青色光受容体ではない⁴⁴⁾ など, (4) *Phycomyces* の光生長および光屈性反応はある三重項状態にあるフラビン分子の吸収する 595 nm の光によって誘導される—青色光の場合と比べると 10^{-9} 倍のエネルギー効率— (Delbrück *et al.*, 1976)。(5) *Neurospora* の青色光による調節反応 (胞子形成の抑制, サーカディアンリズムのシフト, カロチノイド合成など) に関しては, 青色光を吸収したフラビンによる膜結合性チトクローム b の光還元反応が初期反応であるとする考え (チトクロームの含量の低い pocky 変異株の光感受性の低下⁴⁾, また, FAD, チトクローム b_{557} を補欠分子族とする硝酸還元酵素活性は青色光によって影響を受ける²³⁾ などなどいろいろな試みがなされている。この約 10 年間は, それまでになされてきた知見に基づいて, また, ある種のフラビン分子が青色光受容体である可能性が大であるとする前提に立ってなされた, フラビンを支持する説が沢山提出されている。因に, 1980 年に入ってから, カロチノイドを支持する新たな証拠は見当ら

ない。

Phycomyces のリボフラビン要求株は、リボフラビンの代わりにアナログであるロゼオフラビンを取り込んで、リボフラビンは吸収できないがアナログは吸収する 529 nm の光の照射によって光屈性反応を示す³⁶⁾。アナログが本来おさまるべきリボフラビンの場にきちんとセットされ、その分子のみがこの光反応を誘起した保証はないし、また、アナログによる光増感作用による可能性は否定できない。しかし、ある種のフラビン分子が光受容体として働く可能性は強く示している。その他、*Phycomyces* では光受容体をめぐっていろいろな考えが提出されているが、そのうち、Pollock *et al.* (1985) は、青色と共有結合しているフラビンのうち、その含量が青色光照射によって影響を受ける 2 つの分子の存在を認め、青色光受容体の可能性を論じている。一方、*Neurospora* のフラビン要求株を、生長を支持できる程度の低濃度のフラビンを含む培地で生育させると、胞子形成の抑制、サーカディアンリズムの位相のシフト、カロチノイド合成を調節する各々の光反応は、青色光に対して異なった光感受性を示す³⁸⁾。また、デアザフラビン、ロゼオフラビン等は、胞子形成の抑制、サーカディアンリズムの位相のシフトを引き起こす光反応では、リボフラビンの代わりをして光受容体として機能するが、カロチノイド合成の光反応においては機能しない³⁹⁾。これらのことは、各々の光生理現象に対応してそれぞれ独特の働きをするフラビン分子が複数、光受容体として機能していることを示す。一方、青色光照射によって見事に胞子形成が誘起される *Trichoderma* のリボフラビン要求株においては、胞子を形成する際には、栄養生長を行なうより多量のフラビンが必要であり、また、とくに、光誘導後の胞子形成過程でより沢山必要である¹⁷⁾。また、ロゼオフラビンは、胞子形成を光誘導する際にはリボフラビンの良い代役とはならず、むしろ、胞子形成に抑制的に作用したが、光反応とは無関係に栄養のストレスによって誘導される胞子形成は阻害しない¹⁸⁾。従って、*Trichoderma* では、前述したような *Phycomyces*, *Neurospora* の場合のように積極的ではないがフラビン分子が光反応に密接に関係している可能性、アナログはその光反応の近辺で何かをしている可能性が示されている。

このように, ある種のフラビン分子が青色光受容体として機能している可能性, 複数の青色光受容体説の提出が1980年以降の特徴のように思われる。その他, 光受容と関連して, LIAC, signal transduction あるいは cyclic-nucleotides の変動, カロチノイド合成に関する *Neurospora* の *wc*, *al* 変異株, *Trichoderma* の *dim* 変異株を用いて仕事が行なわれている。Photochemistry and Photobiology の yearly review: Photocontrol of fungal development (vol. 47, pp. 889-896, 1988) を参照して下さい。

参考文献

- 1) Aragaki, M. (1962). *Phytopathol.* **52**, 1227-1228.
- 2) Barnett, H.L. and Lily, V.G. (1950). *Phytopathol.* **40**, 80-89.
- 3) Biatczk, J. (1979). *Photochem Photobiol.* **30**, 301-303.
- 4) Brain, R.D., Woodward, D.O. and Briggs, W.R. (1977). *Carnegie Inst. Wash. Year Book*, **76** 295-298.
- 5) Curry, G.M. and Gruen, H.E. (1959). *Proc. Natl. Aca. Sci. USA* **45**, 797-804.
- 6) Curtis, R. (1972). *Plant Physiol.* **49**, 235-239.
- 7) Delbrück, M. and W. Shropshire, Jr. (1960). *Plant Physiol.* **35**, 194-204.
- 8) Delbrück, M., Katzir, A. and Presti, D. (1976). *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* **73**, 1969-1973.
- 9) Durand, R. and Furuya, M. (1985). *Plant Cell Physiol.* **26**, 1175-1183.
- 10) Faraj-Salman, A.G. (1971). *Planta* **101**, 117-121.
- 11) Häder, M. (1983). *Photochem. Photobiol.* **38**, 551-555.
- 12) Honda, Y., Sakamoto, S. and Oda, Y. (1968). *Plant Cell Physiol.* **9**, 603-607.
- 13) Honda, Y., and Nemoto, M. (1984). *Can. J. Bot.* **62**, 2865-2871.
- 14) Honda, Y. and Yunoki, T. (1978). *Plant. Physiol.* **61**, 711-713.
- 15) Honda, Y. and Yunoki, T. (1985). *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* **47**, 327-334.
- 16) Howes, C.D. and Batra, P.P. (1970). *Arch. Biochem. Biophys.* **137**, 175-180.
- 17) Horwitz, B.A. and Gressel, J. (1983). *Plant Physiol.* **71**, 200-204.
- 18) Horwitz, B.A., Malkin, S. and Gressel, J. (1984). *Photochem. Photobiol.* **40**, 763-769.
- 19) Hisiao, K.C. and Björn, L.O. (1982). *Physiol. Plant.* **54**, 235-238.
- 20) Inoue, Y. and Watanabe, M. (1984). *Plant Cell Physiol.* **25**, 107-113.
- 21) Kitamoto, Y., Suzuki, A. and Furukawa. (1972). *Plant. Physiol.* **49**, 338-

- 340.
- 22) Kitamoto, Y., Horikoshi, T. and Suzuki, A. (1974). *Planta* **119**, 81-84.
- 23) Klemm, E. and Ninneman, H. (1979). *Photochem. Photobiol.* **29**, 629-632.
- 24) Kumagai, T. (1982). *Photochem. Photobiol.* **35**, 123-125.
- 25) Kumagai, T. (1983). *Physiol. Plant.* **57**, 468-471.
- 26) Kumagai, T. (1984). *In Blue Light Effects in Biological Systems* (Senger, H. ed.). pp. 29-38.
- 27) Kumagai, T. (1984). *Physiol. Plant.* **59**, 590-594.
- 28) Kumagai, T. (1986). *Can. J. Bot.* **64**, 896-899.
- 29) Kumagai, T. and Björn, L.O. *Physiol. Plant.* **60**, 448-452.
- 30) Kumagai, T. and Oda, Y. (1968). *Dev. Growth Differ.* **11**, 130-142.
- 31) Leach, C.M. (1967). *Can. J. Bot.* **45**, 1999-2016.
- 32) Leach, C.M. (1968). *Mycologia* **60**, 532-546.
- 33) Leach, C.M. and Trione, E.J. (1965). *Plant Physiol.* **40**, 808-812.
- 34) Leach, C.M. and Trione, E.J. (1966). *Photochem. Photobiol.* **5**, 621-630.
- 35) Münöz, V. and Butler, W.L. (1975). *Plant. Physiol.* **55**, 421-426.
- 36) Otto, M.K., Jayaram, M., Hamilton, R.M. and Delbrück, M. (1981). *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* **78**, 266-269.
- 37) Páge, R.M. and Curry, G.M (1966). *Photochem. Photobiol.* **5**, 31-40.
- 38) Paietta, J. and Sargent, M.L. (1981). *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* **78**, 5573-5577.
- 39) Paietta, J. and Sargent, M.L. (1983). *Plant Physiol.* **72**, 764-766.
- 40) Perkins, J.H. & Gordon, S.A. (1969). *Plant Physiol.* **44**, 1712-1716.
- 41) Pollock, J.A., Lipson, E.D. and Sullivan, D.T. (1985). *Planta* **163**, 506-516.
- 42) Presti, D., Hsu, W. and Delbrück, M. (1971). *Photochem. Photobiol.* **26**, 403-405.
- 43) Robert, J.C. and Durand, R. (1979). *Physiol. Plant.* **46**, 174-178.
- 44) Russo, V.E.A. (1986). *Planta* **168**, 56-60.
- 45) Sargent, M.L. and Briggs, W.R. (1967). *Plant Physiol.* **42**, 1504-1510.
- 46) Sproston, T. (1971). *Photochem. Photobiol.* **14**, 571-576.
- 47) Suzuki, Y., Kumagai, T. and Oda, Y. (1977). *J. gen. Microbiol.* **98**, 199-204.
- 48) Valadon, L.R.G., Travis, R.L. and Key, J.L. (1975). *Physiol. Plant.* **34**, 196-200.
- 49) Vakalounakis, D.J. (1986). *J. gen. Microbiol.* **132**, 3485-3489.
- 50) Vakalounakis, D.J. and Christias, C. (1981). *Can. J. Bot.* **59**, 626-628.
- 51) Yamamura, S., Kumagai, T. and Oda, Y. (1977). *Plant Cell Physiol.* **18**, 1163-1166.
- 52) Yli-Mattila, T. (1985). *Physiol. Plant.* **65**, 287-293.

- 53) Zalokar, M. (1955). Arch. Biochem. Biophys. **56**, 318-325.

担子菌類と光

鎌 田 堯

担子菌類は、いわゆる“キノコ”と呼ばれる子実体を発生する仲間である。食用菌としてよく知られているツクリタケ（マッシュルーム）やエノキタケ、また、一般には食用にされないスエヒロタケ、ヒトヨタケなどが、遺伝学、発生学、細胞生物学あるいは分子生物学など、基礎的な研究のための実験材料としてよく用いられている。著者らは実験材料としてウシグソヒトヨタケ（*Coprinus cinereus*）を長年用いており、この菌と光との関わりについて述べたい。

担子菌類は交配系がよく発達していることが大きな特徴の一つである。ヘテロタリズムを示すウシグソヒトヨタケでは、有性孢子である担子孢子は発芽すると一つの細胞内に1個の単相核を持つ一核菌糸を生じる。一核菌糸は栄養成長し、またオイディアと呼ばれる無性孢子を形成して増殖することができる。有性過程は2対の不和合性因子 A , B による支配をうけており、互いに A , B 因子が共に異なる一核菌糸どうしが会おうと、両者の間で細胞質融合が起って核を互いに交換し、1つの細胞内に両菌糸由来の単相核を1個ずつもつ二核菌糸が形成される。二核菌糸は栄養成長した後、一定の環境条件のもとで子実体を発生する。子実体発生における最初の段階は小さな菌糸塊の形成であり、これが分化・成長して子実体原基となる。原基は一夜（ヒトヨ）という短期間で成熟して子実体を完成する。成熟過程において、担子器では2つの単相核は融合して複相核となり、引き続いて減数分裂して担子孢子が形成され、有性過程が完了する。

この生活環における諸過程のなかで、オイディア形成および子実体形成の過程に光が関与していることが知られており、とくに後者の過程における光の関与のしかたは明確である。そこで、以下、ウシグソヒトヨタケの子実体発生における光の役割について、筆者らが行った研究を中心に紹介する。

ウシグソヒトヨタケでは、栄養菌糸から子実体形成が開始され子実体原基になるまでの過程と、原基が成熟し子実体を完成するまでの過程とが明瞭に区別できる。前者の過程には、光が必要とされるという報告³⁾と光を必要としないとする報告がある⁴⁾。培地など光以外の条件の違いが光要求性を変化させるのかもしれない。後者の子実体成熟過程における光要求性は成熟の進行に伴って変化し、次のような5つの相に分けられる⁵⁾：相1の光は成熟開始の引き金作用を持ち、相2の光は成熟の進行を遅らせる。相3は成熟の正常な進行に2.5時間以上の連続暗黒を必要とする段階であり、この暗黒を与えない場合には、成熟は途中で停止する。相4は光が成熟の進行を促進する段階であり、相5では光が成熟に無関係となる。また、相1の光は担子器内の2核を融合させる働きがあり、相3の暗黒は減数分裂の正常な進行に必要であって、この暗黒を与えないと減数分裂前期で停止することが分っている。

筆者らはこれらの光の効果が実際の形態形成や細胞過程に表れるまでの間に何らかの物質が介在していることを仮定して次のようなつぎ木実験を行った。上述のように連続照射下、つまり相3の暗黒を与えない条件下で培養した子実体は成熟の途中で停止するが、この子実体から傘の部分の上半分を除去し、そこに相3の暗黒を与えた子実体の傘の上半分をつぎ木した。すると、つぎ木されたほうの子実体は相3の暗黒を与えられなかったにもかかわらず成熟を完了した。この結果は、相3の暗黒によってある因子が生産され、それが相3を与えられなかった子実体に拡散し成熟を促進したものと解釈される²⁾。

現在、この成熟因子の抽出実験や既知の生理活性物質の投与を行うなどによってこの因子の推定を試みる実験を行っているが、未だこの因子が何であるか全く不明である。しかし、ウシグソヒトヨタケ子実体の成熟過程

における光の効果は、核の融合や減数分裂など基本的な細胞現象と関わっていることなどからも非常に興味深く、特に、相3の暗黒によって生産される成熟因子の同定が是非とも望まれる。この研究の推進によって、光刺激の受容から細胞過程や形態形成など実際の現象が現れるまでの間の、刺激の伝達のしくみに関して何らかの知見が得られるものと期待される。

参考文献

- 1) Kamada, T., Kurita R. and Takemaru T. (1978). *Plant & Cell Physiol.* **19**: 263-275.
- 2) Kamada, T. and Tsuji M. (1979). *Plant & Cell Physiol.* **20**: 1445-1448.
- 3) Morimoto, N. and Oda Y. (1973). *Plant & Cell Physiol.* **14**: 217-225.
- 4) Tsusué, Y.M. (1969). *Dev. Growth & Diff.* **11**: 164-178.



藻類と光 (I)

光走性を中心として 単細胞鞭毛藻類の光運動反応の作用スペクトルと光受容部位

渡 辺 正 勝*

研究協力者: 近藤 孝男*・久保田 守*

門田 明雄**・Randy Wayne***

1. はじめに

生命活動を制御する重要な信号として働いている光を感受している細胞内の光受容物質は何であり、どこに局在していて、どのような微細構造に対応しているのであろうか。この問いに答えるために、まず、大型スペクトルグラフ等の分光照射装置を用いた作用スペクトル測定実験が活発に行なわれている¹⁻⁸⁾。これらの実験等によって、植物ではフィトクロムによる赤・近赤外光可逆反応と、未知の光受容色素による青・近紫外光反応という2つの主要な光信号受容反応があることが知られている⁹⁻¹³⁾。次に、細胞内の光感受部位の局在を探るためには、微光束の刺激光による照射実験がおこなわれ、例えば、シダ植物の原糸体細胞を巧みに用いた実験によって、フィトクロム系と青・近紫外光系のそれぞれの細胞内局在や配向についての興味深い知見が得られている¹⁴⁻¹⁶⁾。

細菌や鞭毛藻類・原生動物・粘菌アメーバ・白血球等の運動の方向性の光による制御〔光走性等〕の反応は、その光受容色素や細胞内信号伝達機

* 基礎生物学研究所

** 東京都立大学理学部

*** Cornell 大学 (Plant Biology)

構の高等動物や高等植物との類似性、その迅速さ、単細胞レベルにおける方向認識の興味深さなどにより、最近、急速に注目を集めている¹⁷⁻²⁵⁾。例えば、ミドリムシ (*Euglena*) の光走性に関しては、Engelman (1882) の部分隠蔽実験により、鞭毛側部の膨らみ (paraflagellar swelling) が光受容部として示唆され、鞭毛側部の膨らみの顕微蛍光分析や、近紫外・可視部における光走性の作用スペクトル (偏光・非偏光) から、鞭毛側部の膨らみに存在すると考えられるフラビン蛋白が光受容色素であるとの説が有力である。この説では、眼点 (eyespot; stigma) は遮蔽器官として光方向の精度よい認識に役立っている補助的な器官と考えられている。一方、最近、緑藻クラミドモナス (*Chlamydomonas*) の光走性に関して、光走性ミュータントに対する各種レチナルアナログ添加後の作用スペクトル¹⁹⁾ や、DNA レベルでのロドプシンとの相同性²²⁾ から、その光受容色素がロドプシンであるとの説が唱えられている。

このような微生物の光運動反応の光受容部位を知ろうとする時は、上に述べた様な微光束刺激光による細胞内局所照射実験を、運動している微生物について行なうことが有用である。このような場合には、微光束照射装置と運動微生物追跡顕微鏡^{26,27)} を一体として組み合わせることが必要になる。本報告では、最近我々が基礎生物学研究所で開発した^{28,29)}、運動微生物追跡・微光束照射顕微鏡 (MICROSCOPE FOR MICROBEAM IRRADIATION OF A MOVING ORGANISM; MIMO スコープ) の構造と機能および細胞個体運動自動解析システム (TRACKER-CELL MOVEMENT ANALYZER SYSTEM; TCMA)³⁰⁾ についてのべ、さらに、これらを用いて解析を始めた単細胞鞭毛藻類の光運動反応の作用スペクトルと光受容部位の検討結果³¹⁾ を報告する。

2. 運動微生物追跡・微光束照射顕微鏡 (MIMO スコープ) の構造と機能 (図 1)

[1] 追跡光学系

顕微鏡下で運動している微生物を追跡するために、まず、波長 700-800 nm の赤外線による暗視野照明で微生物を光らせて、この光点が視野を

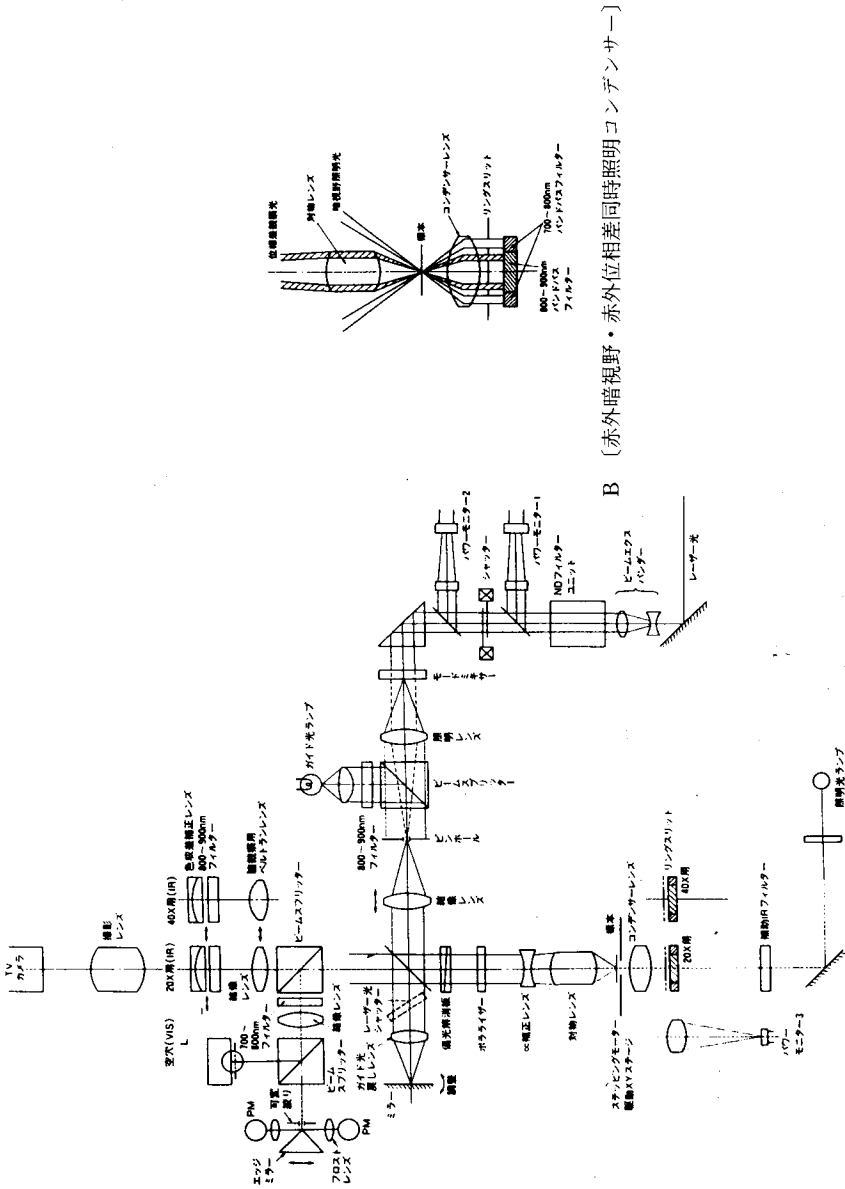


図1 A (運動微生物追跡・微光束照射顕微鏡 (MIMO スコープ) の構造) B (赤外暗視野・赤外位相差同時照明コンデンサー)

図1 A (運動微生物追跡・微光束照射顕微鏡 (MIMO スコープ) の構造)

エッジミラーで X 軸・Y 軸による 4 つの象限にくぎったどの象限にあるかを 4 本のフォトマルチプライヤーで検出する。この光点が常に X 軸と Y 軸の交わる原点にあるように顕微鏡のステージをサーボモーターで駆動する。この原点は視野の中央から視野の $\pm 1/10$ までの機械的微調節が可能である。追跡の範囲は全視野の $1/2$ から $1/10$ まで可変絞りで選択できるので、全視野で目標の微生物を捉えてから視野を絞れば追跡の精度が上げられる。

[2] 観察光学系

標本の状態の観察・記録は、波長 800-900 nm の赤外線による位相差顕微鏡光学系と赤外感受ビデオカメラで行なう。対物レンズは 20 \times と 40 \times である。

照明のためのコンデンサーは、図 1B のように追跡光学系と共通で、その中心軸の周りに半径と波長の異なる環状の 2 つの光束を作って追跡用暗視野照明と観察用位相差照明を同時に行なっている。このようにして得られた 2 種類の重ねあわされた画像情報を、波長の違いを利用してビームスプリッターと干渉フィルターにより追跡用検出系と観察用光学系とで分離して取り出す。

[3] 微光束照射光学系

アルゴンイオンレーザーで励起した色素レーザーにより得られる波長可変 (420-1000 nm) の単色光束 (直径約 1.5 mm) を入射させる。この光束はビームエクspanderで 4 倍の直径に拡大され、減光フィルター、シャッター、モードミキサーを経てピンホールをケーラー照明し、更に結像レンズと対物レンズによって標本の局部を鉛直上方から微光束照射する。このピンホールによる微光束の、標本上での直径 (幾何光学的寸法) は $1\mu\text{m}$ から $250\mu\text{m}$ まで各種可能である。ピンホールは X 軸・Y 軸方向に全視野 (40 \times 対物の時 $500\mu\text{m}$, 20 \times 対物の時 $1000\mu\text{m}$) の $1/2$ の範囲で移動可能である。微光束刺激光を照射する前に狙いを定めるために、波長 800-900 nm のガイド光を用いる。また、レーザー光は偏光しているのでこれを対物レンズの直前で偏光解消板で解消しておいてから、ポラライザーで任意の方向に偏光させる。

[4] ステージ駆動系

顕微鏡下で運動する微生物を常に視野の中心で観察・記録するために、追跡光学系からのフィードバック信号によって、顕微鏡のステージをステッピングモーターで絶えず駆動する。最初に微生物を視野内に捉える迄はトラックボールと土の X キー・Y キーによる手動モードでステージを駆動し、目標を捉えてからは自動追跡モードで駆動する。ステージ駆動範囲は X 軸・Y 軸ともに ± 10 mm, 最高スピードは 2 mm/sec, 最小分解能は 0.2 μ m である。このステージの動きは、その位置信号出力(アナログ・デジタル)によって X-Y レコーダー等で記録・解析できるので、逆に微生物の動きを知ることができる。

3. 細胞個体運動の自動解析システム (TRACKER-CELL MOVEMENT ANALYSER SYSTEM; TCMA) (図 2)

単細胞鞭毛藻類の光運動反応を様々な立場から解析するためには、細胞集団レベルでの分布変化のみならず、細胞個体の運動のレベルで、遊泳方向、遊泳速度等を時間の関数として精密に記録・測定することが重要である。この目的に適したコンピューター化ビデオ法を新たに開発したので、その構成と機能について述べる。

TCMA システムは、1 インチシリコンビジコンカメラ (C1000-02, 浜松ホトニクス) と付属のビデオスライサー (M1005), I/O バッファー (M998); Z80A-CPU による 8 bit マイコンシステム (BIWAC DMS-808, ディジテック) (ビデオ処理ボード 2 枚, 64 k byte SRAM ボード 2 枚, 及び 1 M byte フロッピーディスクドライブ 2 台を含む) より成る。これにより、顕微鏡視野中の多数の細胞の運動軌跡は一定時間区分毎に“スーパーフィールド”としてフロッピーディスクに記録される。“スーパーフィールド”は、カラープリンター (G500, 三菱電機) によって、異なる時間区分に対しては異なる色で印刷されるか、或いは、16 bit マイコン (PC-9801VM, 日本電気) で動作する解析プログラム (Turbo Pascal 言語で近藤が開発; CELL MOVEMENT ANALYSER; CMA) によって解析されて、遊泳方向、遊泳速度等の統計データを与える。

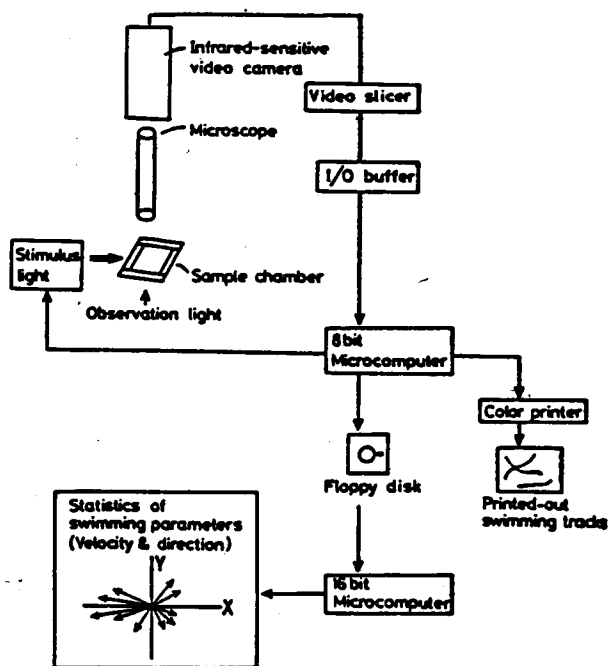


図 2

4. 単細胞鞭毛性緑藻ドナリエラの光驚動反応の光受容部位： 作用スペクトルと運動細胞の部分照射による研究

[1] システム

運動微生物追跡・微光束照射顕微鏡（MIMO スコープ）を用いて、自由に運動している細胞の部分照射を行ない、緑藻ドナリエラの Step-up 光驚動反応の光受容部位を調べた。

ドナリエラ細胞の光照射およびその運動の追跡はすべて MIMO スコープを用いて行なった。細胞はスライドガラスにマウントし、MIMO スコープに装備したビデオカメラ、ビデオモニターを通して赤外光下(>700 nm)で観察した。運動細胞は追跡ステージによりモニター画面中央に維持し、これに微光束照射を行なう。TCMA システムで測定したドナリエラの Step-up 光驚動反応の作用スペクトルは 510 nm 付近にピークを持つ（図 3）た

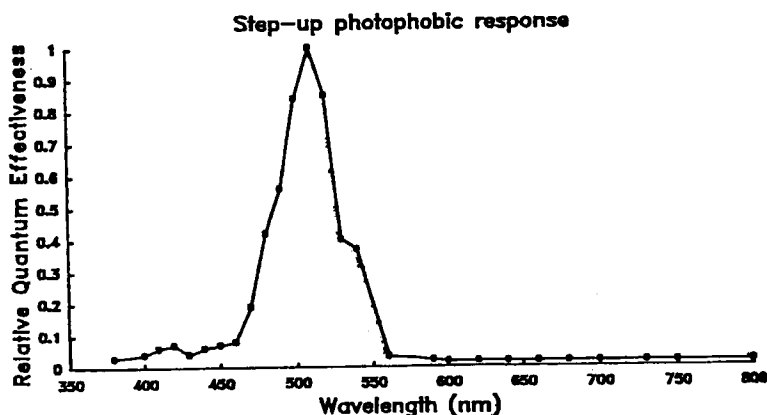


図 3

め、刺激光として Ar イオンレーザー (Innova 20, Coherent) から得られる 514.5 nm の CW 光を用いた。刺激光の光強度は ND フィルターを用いて調節し、シリコンフォトダイオード (S1337-66BQ, 浜松ホトニクス) で測定した。細胞の運動軌跡は XY レコーダーに記録した追跡ステージの動きから解析した。

[2] Step-up 光驚動反応

細胞全体を 514.5 nm レーザー光照射 (5 s) し、その運動軌跡を調べた。細胞は光照射開始直後に運動方向を変化させ、一時的に運動停止した後、再び運動を再開することが明らかとなった (図 4)。そこで光照射開始直後に 90° 以上運動方向を変化させる個体の割合を光驚動反応の指標として、光強度と反応の関係を調べた。その結果、 $9.8 \times 10^{14} \sim 2.8 \times 10^{16} \text{ photons cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ($3.8 \sim 110 \text{ W m}^{-2}$) の範囲で反応はほぼ光強度の対数に依存して大きくなることがわかった。

[3] 細胞部分照射の効果

$1.4 \times 10^{16} \text{ photons cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (54 W m^{-2}) のレーザー微光束を細胞の鞭毛を含む前半分あるいは後半分に部分照射 (1 s) して反応を比較すると、前半分を照射した場合のみ反応が誘導されることがわかった (表 1)。このことはドナリエラの Step-up 光驚動反応を制御する光受容色素が細胞の前半

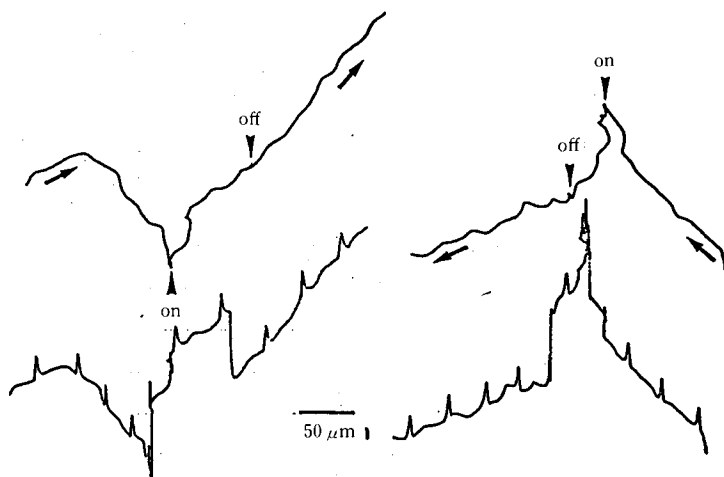


図 4

表1 Effect of partial irradiation of a cell on the step-up photophobic response of *Dunaliella*. Cells were irradiated with a crescent-shaped microbeam 514.5 nm light of 1.4×10^{16} photons $\text{cm}^{-2}\text{s}^{-1}$ (54 Wm^{-2}) and the percentage of cells which showed instantaneous turn of more than 90 degrees was scored. Anterior region includes flagella. n: number of cells irradiated.

Region irradiated	Photophobic response(%)	n
Whole cell	40.7	54
Anterior region	31.0	58
Posterior region	6.3	32
Dark control	5.0	360

分に局在していることを示している。

参考文献

- 1) Borthwick, H.A., Hendricks A.B., Parker M.W., Toole E.H. and Toole V. K. (1952). Proc. Natl. Acad. Sci. USA **38**: 662-666.
- 2) Hartmann, K.M. (1983). Action spectroscopy. In Biophysics. (Hoppe W., Lohmann W., Markl, H. and Ziegler, H. eds.), Springer-Verlag, Berlin, 115-144.

- 3) Schaefer, E., Fukshansky, L. and Shropshire, W., Jr. (1983). Action spectroscopy of photoreversible pigment systems. *In Encyclopedia of Plant Physiology (New Series)*, Vol. 16A, Photomorphogenesis. (Shropshire W., Jr. and Mohr H. eds.), Springer-Verlag, Berlin, 39-68.
- 4) Watanabe, M., Furuya, M., Miyoshi, Y., Inoue Y., Iwahashi, I. and Matsumoto, K. (1982). *Photochem. Photobiol.* **36**: 491-498.
- 5) 渡辺正勝 (1984). 精密機械, **50**, 1721-1728.
- 6) Watanabe, M. (1985). The Okazaki Large Spectrograph and its application to action spectroscopy. (Plenary Lecture), *In Photobiology 1984*. (Longworth J.W., Jagger J. and Shropshire W., Jr. ed.), Praeger, New York, 37-44
- 7) Watanabe, M. (1988). Photomed. Photobiol. (In press).
- 8) 渡辺正勝 (1989). 作用スペクトルと大型スペクトログラフ 蛋白質核酸酵素 増刊号「視覚の分子メカニズム—微生物よりヒトへの展開—」(津田基之, 前田章夫編) 共立出版, 東京 (印刷中).
- 9) 古谷雅樹 (1976). 「フィトクロム」, 岩波書店, 東京.
- 10) Senger, H. (ed.) (1980). The Blue Light Syndrome. Springer-Verlag, Berlin.
- 11) 井上康則 (1981). 青色光吸収色素, 「環境情報」(古谷雅樹編), 朝倉書店, 東京 20-33.
- 12) Serger, H. (ed.) (1984). Blue Light Effects in Biological Systems. Springer-Verlag, Berlin.
- 13) Furuya, M. (ed.) (1987). Phytochrome and Photoregulation in Plants. Academic Press, New York.
- 14) Wada, M. and Furuya, M. (1978). *Planta* **126**:85-90.
- 15) Furuya, M., Wada, M. and Kadota, A. (1980). Regulation of cell growth and cell cycle blue light in *Adiantum* gametophytes. *In The Blue Light Syndrome*. (Senger, H. ed.), Springer-Verlag, Berlin, 119-132.
- 16) Wada, M. and Kadota, A. (1987). Photo- and polarotropism in fern protonemata. *In Phytochrome and Photoregulation in Plants*. (Furuya M. ed.), Academic Press, New York, 239-248.
- 17) Häder, D.-P. (1978). Photomovement. *In Encyclopedia of Plant Physiology (New Series)*, Vol. 7, Physiology of Movement. (Haupt W. and Feinleib M.E. ed.), Springer-Verlag, Berlin, 268-309.
- 18) Foster, K.W. and Smyth, R.D. (1980). *Reviews* **44**: 572-630.
- 19) 渡辺正勝 (1981). 走性反応, 「環境情報」(古谷雅樹編), 朝倉書店, 東京, 197-211.
- 20) 渡辺正勝 (1981). 鞭毛藻類の光走性, 「光運動反応」(古谷雅樹編), 共立出版, 東京, 30-57.
- 21) Foster, K.W., Saranak, J., Patel, N., Zarilli, G., Okabe, M., Kline, T. and

- Nakanishi, K. (1984). *Nature* **311**: 756-759
- 22) Martin, R.L., Wood L., Baehr, W. and Applebury, M.L. (1986). *Science* **232**: 1266-1269.
- 23) Ishijima, S. and Witman, G.B. (1985). *J. Cell Biol.* **101**: 290a.
- 24) Ruffer, U. and Nultsch W. (1985). *Cell Motility* **5**: 251-263.
- 25) Ueda, T., Mori Y., Nakagami T. and Kobatake Y. (1988). *Photochem. Photobiol.* **47**: 271-276.
- 26) Berg, H.C. (1971). *Rev. Sci. Instr.* **42**: 868-871.
- 27) Berg, H.C. (1972). *Nature* **239**: 500-504.
- 28) Watanabe, M. (1986). Tunable two-wavelength CW laser irradiation system. *In* Proc. XVI Yamada Conf. Phytochrome and Plant Photomorphogenesis. (Organized by M. Furuya), 160.
- 29) 渡辺正勝 (1987). Olympus Microscope Review '87, No. 13, 24-27.
- 30) Kondo, T., Kubota, M., Aono, Y. and Watanabe, M. (1988). *Protoplasma* (1988) [Suppl 1] 185-192.
- 31) Kadota, A., Wayne, R., Kubota, M. and Watanabe, M. (1988). Intracellular photoreceptive site for the step-up photophobic response in a green alga, *Dunaliella salina*. Proceedings of Yamada Conference XXI on Molecular Physiology of Retinal Proteins (Hara, T. ed.). Yamada Science Foundation, Osaka, 369-370.

藻類と光 (II)

光屈性を中心にして

片岡博尚

1. はじめに

水中で生活する藻類にとっては光が最も重要な生態要因であろう。陸上植物のように乾燥に堪える仕組みも自重を支えるための強固な構造も水の中では必要でない。藻類はおもに光走性や光屈性を用いて分布域を変えている。光走性が運動器官を持って自由に移動できる単細胞性藻類および生活史のある局面で現れる配偶子や遊走子でみられるのに対し、運動器官を持たないで定着生活を送るものではその植物体の一部の成長方向を光強度によってかえる光屈性が見られる。光にむかう正の光屈性は陸上植物の上部器官に相当する葉状体 (thallus, frond) の先端や辺縁部^{1,4,7,10)}、あるいは糸状コロニーの先端細胞³⁰⁾ 等でみられる。負光屈性は仮根^{1,4,7-11,32)} や褐藻類の付着器官 (haptera)²⁾ でごく一般にみられる。正重力屈性が仮根の下向きの成長に寄与している場合¹⁰⁾ も報告されているが、普通は負光屈性だけが働いているようである。しかし、それを明らかにするために、例えば、光を水平2方向から照射するなどの厳密な研究はほとんど行われていない。正屈曲についてもほとんどは観察の域を出ていない。藻類での光屈性はフシナシミドロでの研究が最も進んでいるが^{2,13-28)}、それでも陸上植物でのそれらと比べるとまだ端緒に着いたばかりといってよい。藻類の光屈性についての1981年までの一般的な研究の歴史と状況については総説^{20,21)} に述べたので、今回はそれ以後の、特に、光強度が高くなったときに起こる

フシナシミドロの正から負への屈曲方向の転換がカルシウムによって制御されているという最近の発見とその研究法、将来の展望に焦点を絞って報告したい。

2. 正屈曲から負屈曲への転換

Pfeffer (1904) はフシナシミドロ、ヒゲカビ、ガーデンクレスの茎は光強度が高くなるにしたがって、光に向かう正屈曲から光から遠ざかる負屈曲に変わると彼の教科書³¹⁾の中で記載しているが、フシナシミドロ以外で、本当に光強度に依存して屈曲の逆転が起こるというその後の報告はない。強すぎる日光から逃れるための負光屈性は常識的にありそうなことであるし、生態学的にも重要な反応であるはずだが、奇妙なことに光強度に依存した負光屈性は *Avena* 子葉鞘の一次負屈曲以外には他の高等植物やヒゲカビ胞子嚢柄でも知られていない^{5,6)}。他の藻類やコケ、シダなどでもこのような屈性の転換をごく普通に見かけるとなると錯覚を覚えるが、そのような報告は寡聞にして知らない。将来、この点についてもっと広範な探索が成されなければならない。

一方、フシナシミドロ (*Vaucheria*) については Pfeffer の記載が正しいことを既に観察しているし、*V. geminata* で、縦半照明法^{13,14,18,23)}による光量—反応曲線の解析から、二次正屈曲と小さいながらも負の屈曲が大光量域でみられることを 1977 年に¹⁶⁾報告している。正から負への転換は別の種オカフシナシミドロ (*Vaucheria terrestris*) ではさらに低い光強度で起こる。白色光では約 6 Wm^{-2} ですでに負屈曲が起こるので、おそらく自然の生育状態では負屈曲を示していると思われる。さらに別の種 *V. sessilis* では、 10 Wm^{-2} でも正屈性を示している²⁶⁾。オカフシナシミドロは名前通り温室に保つと空気中にはい上がって来るので、他の種より強い光を受けることが考えられる。そして、これが鋭敏な屈性転換への進化をもたらしたことは想像に難くない。しかし、現在、そうした生態的意義や進化についての議論をするための基本的な生理学的知識は皆無といってよい。ここで、我々が問題にしようとしていることは光強度が増したときに起こる正から負への屈曲方向の転換であり、仮根などで見られる生来の (intrinsic

な)負屈曲ではないことに注意していただきたい。緑藻ハネモ (*Bryopsis*), マガタマモ (*Boergesenia*), 紅藻カザシグサ (*Griffithsia*) の仮根, 褐藻チガイソ (*Alaria*) のハブテラで負光屈性が報告されているが^{3,7-9,32)}, それらはすべて光強度に無関係に常に負の屈性を示している。もっともこれらも将来研究が進めば, 今回扱う反応と共通の機構, 装置が働いていることが明らかになるかも知れない。

負光屈性の研究が遅れた原因は実験室で, 光屈性に有効である強力な青色光源を得るのが難しかったことと, 負屈曲を起こすには 10 時間以上の照射と観察時間が必要であったためである。そこで, まず実験室で, 普通の光源を用いて, 10-20 分以内に負屈性を起こす方法を開発した。本稿では, この方法により得られた発見, すなわち, 光屈性の方向転換に, 青色光による Ca の流入と蓄積が関係していることについて述べ, 青色光の強度と方向の受容, そして屈曲方向と大きさの制御における Ca の役割についての仮説を提唱するが, その前に, オカフシナシミドロでの正光屈性の歴史と, 開発した方法を説明し, それによって起こる負屈性が, 自然状態で長時間かけて起こるものと同じ反応と見なせる根拠について触れよう。

3. オカフシナシミドロの正光屈性

淡水産黄緑色藻オカフシナシミドロ (*Vaucheria terrestris* sensu Götz var. *terrestris*) は直径 60-80 μm の疎らに分岐する管状ケノサイトよりなり, 各枝の先端で典型的な先端成長をしている。細胞の先端から 15-20 μm は葉緑体の無い透明帽となっている。この透明帽領域で光受容から屈曲までの光屈性の全ての反応が完了する。光屈性は青色光によって起こり, 赤色光は何の効果も持たない^{12,18,19)}。光屈性では植物は光強度だけでなく光の方向も受容しなければならないが, フシナシミドロでは一方向から照射された青色光はこの透明帽領域の光源に面した側でより多く吸収され, その側での局所的成長促進が成長点の光源側への移動となり, (この機構を突出屈曲, Bulging と呼ぶ)^{13,14,20,21)} 正屈曲が起こる。

もし, 十分暗順応した細胞先端が均等に青色光で照射されるとその先端成長が一時的に促進される。これは正光成長反応 (positive light-growth

response) と呼ばれる反応で、突出屈曲で曲がるフシナシミドロのような先端成長細胞では原理的に正光成長反応及び正屈曲の原因と考えることができる^{21,24}。振動電極法を用いた研究で、フシナシミドロの先端は他の多くの先端成長細胞^{11,12,33~35}と同様に、成長が続いている限り電流の流入点となっており^{28,29}、青色光照射によりこのイオン電流流入が正光成長反応に先だって著しく増大することが知られている²⁸。負屈曲は正屈曲が起こった後で、あるいは少なくともその反応が開始した後で起こるはずである。従って、負屈曲は光源側での成長の減速によって開始すると思われるが、まだ、その詳しい解析はしていない。均等照射を何度も繰り返すと、振動電極法で測定できる青色光依存の内向き電流がだんだん減少することを観察している²⁸ので、内向き電流と成長促進とは一対一に対応していると考えられる。

4. 方法：強い青色背景光を同時照射すると負屈曲が起こる

青色光一方向照射を強い青が緑 (≤ 536 nm) の均等な背景光のもとで行うと、背景光の強度と外液中の Ca^{2+} 濃度に依存して負屈曲が現れた。図1に装置の概略を示す。倒立顕微鏡ステージ上のペトリ皿にフシナシミドロを横たえ、活発に成長している先端を選び、紙面に垂直な方向に（手前から向こうへ）向ける。一方向からライトガイドで導いた一定強度 (1.7

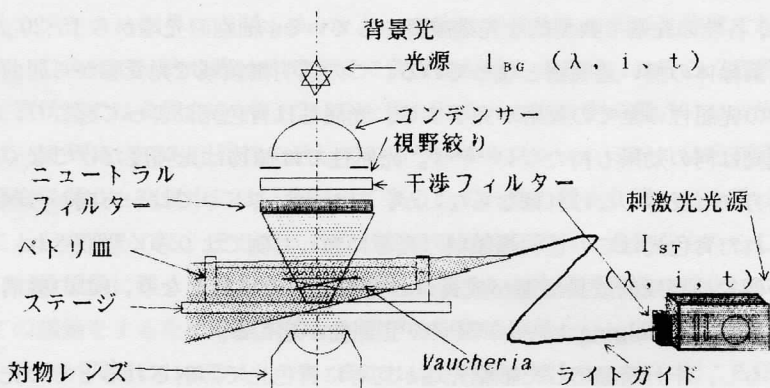


図1 一方向照射と背景照射の同時照射法

Wm^{-2} の青色光 (456 nm) を照射する。先端に対する照射角度が常に一定となるようライトガイドを固定する。通常の観察や屈曲測定には顕微鏡付属の光源に赤 (660 nm) や緑 (536 nm) の干渉フィルターと中間色フィルターを取り付け強度を落として上から照射する。ニュービコン TV カメラ及びビデオレコーダーを用いて観察、記録する。

観察用の上からの背景光を強い ($\leq 40 \text{ Wm}^{-2}$) 青色光 (450 nm) や緑色光 ($\leq 536 \text{ nm}$) に変えたとき一方向からの青色光から遠ざかる方向の、すなわち、負屈曲がある割合で現れた。一方向からの刺激光より十分に強い青色光を背景光に使えば、先端両側の光吸収の傾斜がなくなるので、屈曲は 0 に近づくだけで負にはならないはずである。負屈曲を説明するためには、別に青色光によって徐々に蓄積する概念的阻害物質を想定し、その濃度が一方向照射側でより高くなることを考えなければならない (図 2)。

負屈曲の現れる頻度やその大きさは一方向からの青色光と同時に与えた背景光強度が増すにしたがって大きくなり、背景光を 5-10 分前から与えることによってやや増加した。

では 10 倍以上強い上からの青色光に対して、どうして下向きの屈曲が起きないかという疑問が湧く (大瀧私信)。この実験では正確には同時に下向

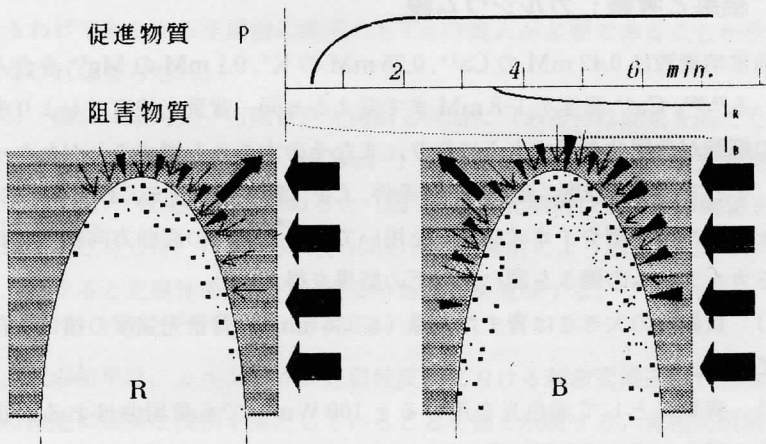


図 2 背景光が赤 (左), あるいは青 (右) のとき概念的に予想される正屈曲促進物質 (P) と阻害物質 (I) の分布を示す模式図

きの屈曲が起こってくるはずである。そして、観察者は対物レンズ側への屈曲をほとんど検出できず実際の屈曲の水平面への投影像を観察していると考えられる。しかし、一方、藻体はカバーガラスで軽く押さえられ上下方向への屈曲が力学的に制限されているため、長時間の実験によっても下方向の屈曲は僅かであろう。従って、この方法では一方向からの青色光に対して正、あるいは負の屈曲だけを扱っても十分に安全であると言える。

さらに深刻な疑問はこの方法で起こる負屈曲は自然の状態で起こる負光屈性とは異なるものではないかということであろう。自然界で負光屈性は一方向からの光によって起こるものでもないし、単色の青色光で起こるものでもないので、厳密な同一性を云々することは非生産的であるが、現実の生理的機構を考えて尚この系が負光屈性のモデル足りうるかを考察してみよう。そもそも負屈性は光源側でもその反対側でも光受容体が飽和してしまってから起こる反応である。受容体分子が脱色されるか壊れるかはまだ問題にできないし、する必要は無い。自然状態では長時間かかることを強力な青色背景光を同時に与えることにより人為的に 10-20 分で起こしただけであるとすれば、この系は負光屈性のモデルとして扱うことができるだろう。現在の所、問題は無いと思う。

5. 結果と考察：カルシウム説

通常培養液は 0.42 mM の Ca^{2+} , 0.25 mM の K^{+} , 0.1 mM の Mg^{2+} を含んでいる^{24,26)}。 Ca^{2+} 濃度を 1-8 mM まで変えると同一背景光強度でもより多くの細胞が負屈曲を示すようになり、またその大きさも増すことがわかった。そこで背景光強度、波長、照射条件、 Ca^{2+} 濃度等を変え、あるいは Ca チャンネル阻害剤やイオノフォアを用いて正から負への屈曲方向転換におけるカルシウムの働きを調べ、以下の結果を得た^{25,26)}。

1) 負屈性の大きさは青または緑 ($\leq 536 \text{ nm}$) の背景光強度の積に依存して増す。

2) 背景光として赤色光を用いると 100 Wm^{-2} でも負屈曲はおろか正屈曲の減少もほとんど起こさない。

3) Ca の効果は特異的である。0.4 mM の Ca^{2+} の存在下に Mg, Sr ある

いは Ba を 1-4 mM 加えても Ca の効果を代行することはできない。Mg, Ba は害作用が強い。Sr は成長の持続はある程度できるが、興味深いことに光屈性を正にも負にも起こさなくなる。

4) Ca チャンネルの阻害剤, La^{3+} , ヴェラパミル, ニフェジピンおよびニトレンジピンは負屈曲の出現を阻害する^{25, 26, 及び未発表データ}。4 mM Ca^{2+} と 2 μM La^{3+} の組合せでも負屈曲が完全に阻害される。暗室内で一方に置いた青色蛍光灯からの光で培養すると 4 mM の Ca^{2+} を含む培地ではある位置から U ターンする, つまり, 負屈曲が現れるのに対し 10 μM La^{3+} を 0.42 mM の Ca^{2+} を含む培養液に加えたときは直進をつづける²⁵⁾。このことは自然状態でも Ca の流入が負屈性の原因であることを示唆する。

これらの結果から一方向照射であれ均等照射であれ, 536 nm より短波長の強い光により細胞先端部で Ca^{2+} の流入が起こり, 細胞内 Ca^{2+} 濃度がある値以上になると負の屈曲が引き起こされるという仮説を引き出すことができる。つまり, 上で想定した阻害物質とは青色光や緑色光により引き起こされる Ca の流入とその結果の細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇であると考えられるわけである。Ca 欠乏やヴェラパミルの添加が青色光による電流流入を促進し不応期を短くする事実²⁸⁾ はそれら Ca チャンネル阻害剤による負光屈性の阻害とよく一致する。この仮説では, 少光量の青色光でも Ca の流入を考えるわけであるから正屈曲の発現にも Ca の流入が必要であることが示されなければならない。

5) 確かに短時間一方向青色光照射と同時に (あるいは効果を際立たせるために 5 分前から) 強い (40 W m^{-2}) 青緑色 (503 nm) の背景光を照射して, 光量 - 反応曲線を求めると (図 3) 背景光照射は正屈曲の閾値を 8 倍以上小さくした。すなわち, 短時間の背景光照射により細胞内 Ca^{2+} が少し上昇すると光屈性の感受性が高まったことを意味する。

上記の結果は, カルシウムが光屈性反応における刺激変換過程や屈曲方向の決定に重要な役割を果たしていることを強く示唆する。青色光照射による一時的な膜電位の脱分極 (片岡未発表) やサイクリック AMP による光屈性の感度の低下¹⁵⁾ 等と関係がある可能性がある。将来 Ca^{2+} のインフ

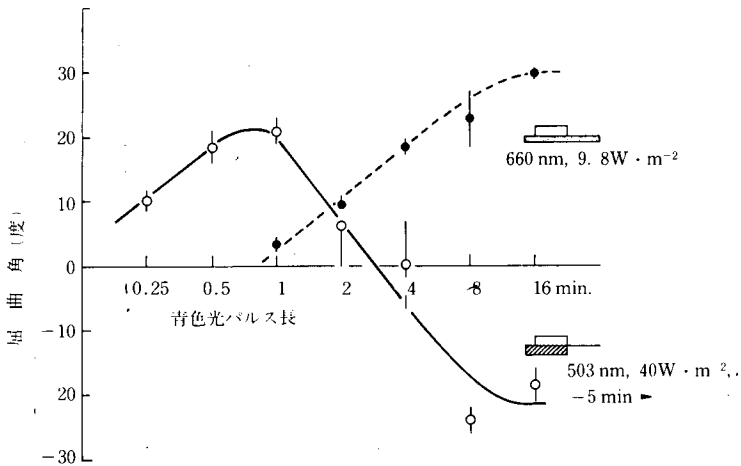


図3 青緑色背景光 (503 nm, 40 Wm⁻²) の有無による光量—屈曲角曲線の左側 (高感度側) への移動。赤色 (660 nm) 背景光による曲線 (点線) はコントロール。屈曲上昇部の両曲線は平行であることに注意。Kataoka²⁶⁾ より改変・転載。

ラックスと細胞内濃度の測定に取り組みたい。また、例えば基礎生物学研究所の強力な青色光レーザーを一方向照射の光源に用いて背景光無しで屈曲転換点を求めることも計画している。

高等植物器官やヒゲカビ孢子嚢柄が負光屈性を示さないこと、あるいは藻類などの仮根が負光屈性しか示さないことを、将来例えばカルシウムチャンネルの分布密度やカルシウム代謝系の特性などから解明できないかと夢みている。

参考文献

- 1) Banbury, G.H. (1959). Pflanzenphysiol. 17(1): 530-578.
- 2) Briggs, W.R. and Blatt, M.R. (1984). Blue light response in the siphonaceous alga *Vaucheria*. In Blue Light Syndrome. (Senger, H. ed.) pp. 261-268.
- 3) Buggeln, R.G. (1974). J. Phycol. 10: 80-82.
- 4) Dring, M.J. (1988). Ann. Rev. Plant Physiol. 39: 157-174.
- 5) Iino, M., Briggs, R. and Schäfer, E. (1984). Planta 160: 41-51.

- 6) Iino, M. and Schäfer, E. (1984). Proc. Nat. Acad. Sci. USA **81**: 7103-7107.
- 7) 伊関峰生 (1988). 巨大単細胞性緑藻ハネモにおける先端成長の光制御機構に関する研究. 東北大学理学博士学位論文.
- 8) Ishizawa, K. and Wada, S. (1979a). Plant Cell Physiol. **20**: 983-987.
- 9) Ishizawa, K. and Wada, S. (1979b). Plant Cell Physiol. **20**: 973-982.
- 10) Jacobs, W.P. and Olson J. (1980). Am. J. Bot. **67**: 141-146.
- 11) Jaffe, L.F. (1980). Control of plant development by steady ionic currents. In Plant Membrane Transport Current Conceptual Issues. (Spanswick, R.M., Lucas, W.J., Dainty, J. eds.), pp. 381-388 Elsevier/North-Holland: Biomedical Press.
- 12) Jaffe, L.F., Nuccitelli, R. (1974). J. Cell Biol. **63**: 614-628.
- 13) Kataoka, H. (1975a). Plant Cell Physiol. **16**: 427-437.
- 14) Kataoka, H. (1975b). Plant Cell Physiol. **16**: 439-448.
- 15) Kataoka, H. (1977a). Plant Cell Physiol. **18**: 431-440.
- 16) Kataoka, H. (1977b). Plant Cell Physiol. **18**: 473-476.
- 17) Kataoka, H. (1979). Plant Cell Physiol. **63**: 1107-1110.
- 18) Kataoka, H. (1980). Phototropism: determination of an action spectrum in a tip-growing cell. In Handbook of Phycological Methods III. Developmental & Cytological Methods. (Gantt, E. ed.) pp. 205-218. Cambridge Univ. Press, Cambridge.
- 19) Kataoka, H. (1981). Plant Cell Physiol. **22**: 583-595.
- 20) 片岡博尚 (1981a). 下等緑色植物の光屈性 In 光運動反応 (古谷雅樹 編) pp 147-176 共立出版 東京.
- 21) 片岡博尚 (1981b). 屈性反応 In 植物生理学 8. 環境情報 (古谷雅樹 編) pp 211-245 朝倉書店 東京.
- 22) Kataoka, H. (1982). Bot. Mag. Tokyo **95**: 317-330.
- 23) 片岡博尚 (1983). 屈性運動 In 実験生物学講座 16. 植物生物学 II. (勝見允行, 増田芳雄 編) pp. 254-265 丸善, 東京.
- 24) Kataoka, H. (1987). Plant Cell Physiol. **28**: 61-71
- 25) Kataoka, H. (1988). Blue light-induced increase in Ca uptake and the negative phototropism in *Vaucheria*. Third International Phycological Congress, Abstract p. 21. Monash Univ., Melbourne.
- 26) Kataoka, H. (1988). Plant Cell Physiol. **29**: 1323-1330.
- 27) 片岡博尚 (1989). 屈性 In 現代植物生理学 4. 環境応答 (新免輝男 編) (準備中) 朝倉書店 東京.
- 28) Kataoka, H. and Weisenseel, M.H. (1988). Planta **173**: 490-499.
- 29) Kicherer, R.M. (1985). Endogene und Blaulicht-induzierte Ionenströme bei der Alge *Vaucheria sessilis*. Dissertation zu Univ. Erlangen-Nürnberg.

- 30) Neuscheler-Wirth, H. (1970). *Z. Pflanzenphysiol.* **63** : 238-260.
- 31) Pfeffer, W. (1904). *Pflanzenphysiologie* 2-2, 986. Verlag von Wilhelm Engelmann, Leipzig
- 32) Waaland, S.D., Nehlsen, W. and Waaland, R. (1977). *Plant Cell Physiol.* **18** : 603-612.
- 33) Weisenseel, M.H. (1979). Induction of polarity. *In Encyclopedia of Plant Physiology*. 7. (Haupt, W. and Feinleib, M.E. eds.). pp. 485-505.
- 34) Weiseneel, M.H., Nuccitelli, R. and Jaffe, L.F. (1975). *J. Cell Biol.* **66** : 556-557.
- 35) Weiseneel, M.H. and Kicherer, R.M. (1981). Ionic currents as control mechanism in cytomorphogenesis. *In Cell Biology Monograph* 8. *Cytomorphogenesis in Plants*. (Kiermayer, O. ed.), pp. 379-399, Springer Verlag. Wien, New York.

高等植物と光からのコメント

菅井道三

単純な体制をもつ微生物を用いた光形態形成の研究は、単細胞における走光性や驚動反応、菌糸や孢子囊柄の成長や光屈性、孢子囊や子実体の形成、さらにはカロチノイド形成などその現象の多彩さに驚かされる。

シダという、高等植物からはいささか外れた材料を用いて光形態形成の研究の仕事を進めてきたものとしては、僭越な気持ちではあるが若干のコメントをさせていただきたい。

1. 光受容体色素

バクテリアから種子植物にいたる植物界を見渡すと光合成植物における光合成以外にほとんど全ての植物で、その行動、成長、分化等を決定する環境情報として光が利用されている。光情報の受容体色素としてはクロロフィル、フィトクロムのほか、いわゆる近紫外 - 青色光吸収色素の存在が知られている。

表1にはこの3種の色素を受容体とするであろうと考えられている現象を、分類群ごとに若干の属について例示してみた。

この表から明らかなように、フィトクロムは藻類、コケ、シダおよび種子植物においてその存在が知られているが、細菌、粘菌、菌類では現在のところ存在が知られていない。バクテリオクロロフィルをもつ細菌と、未だその存在が知られていない黄藻を除けば全ての分類群のクロロフィルをもつ植物ではフィトクロムの存在が確認されている。このことはフィトク

表1 植物界における光形態形成現象とその光受容体の分布

	Phytochrome	NUV-Blue	Chlorophyll
細菌 <i>Mycobacterium</i> <i>Halobacterium</i>		carotenogenesis photophobic action	bacteriochlorophyll
粘菌 <i>Dictyostereum</i> <i>Acrasis</i>		phototropism fruit body formation	
菌類 <i>Pilobolus</i> <i>Phycomyces</i> <i>Neurospora</i> <i>Trichoderma</i> <i>Alternaria</i> <i>Fusarium</i>		phototropism phototropism carotenogenesis conidium formation conidium formation carotenogenesis	
藍藻 <i>Phormidium</i> <i>Anabaena</i>		phototropism phototaxis	+
紅藻 <i>Porphyra</i> - -	spore coat formation		+
黄藻 <i>Vaucheria</i>		chloroplast movement	+
褐藻 <i>Laminaria</i>		oogenesis	+
緑藻 <i>Euglena</i> <i>Volvox</i> <i>Nitella</i> <i>Mougeotia</i>	rhizoid formation chloroplast movement	phototaxis phototaxis chloroplast movement	+
蘇類 <i>Funaria</i> <i>Ceratodon</i>	spore germination phototropism	chloroplast movement	
苔類 <i>Marchantia</i>	ageing		+
した類 <i>Adiantum</i> <i>Pteris</i>	chloroplast movement polarotropism spore germination	chloroplast movement polarotropism spore germination	+
種子植物 <i>Avena</i> <i>Lactuca</i> <i>Pharbitis</i>	stem elongation seed germination flower bud formation	phototropism	+

ロムの存在がクロロフィルを持つ光合成植物の出現と密接に関わっていることを示すといえよう。これらの点からすれば高等緑色植物と緑色微生物とではフィトクロム系を介する光形態形成の研究においてその方法論は本質的に同じといえよう。

これに対して紫外—青色光吸収色素系が光受容体となると考えられている現象は、ほとんどすべての分類群にわたって見いだされている。その作用スペクトルの形が殆ど同じである現象が微生物から高等植物にわたって知られていて、光受容体色素の共通性が示唆される¹⁾。

2. 作用スペクトル

フィトクロムのような光可逆性を持つ場合を除いては光形態形成に関与する受容体色素の特定は容易ではない。作用スペクトルの測定は受容体色素の特定のための有効な手段ではあるが、見かけ上の作用スペクトルを問

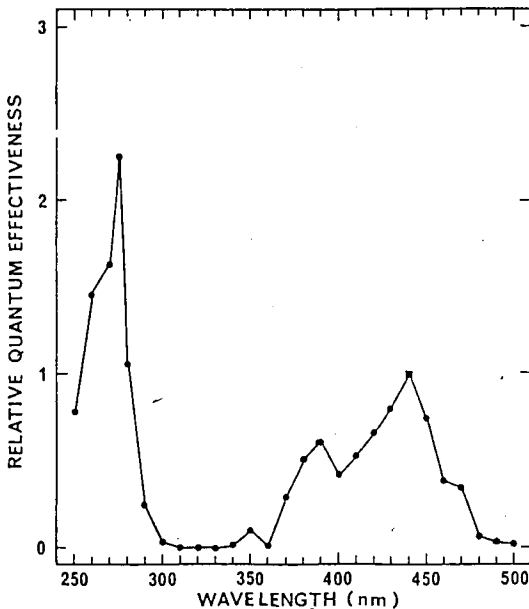


図1 ホウライシダ胞子の赤色光による発芽を抑制する紫外—青色域での作用スペクトル

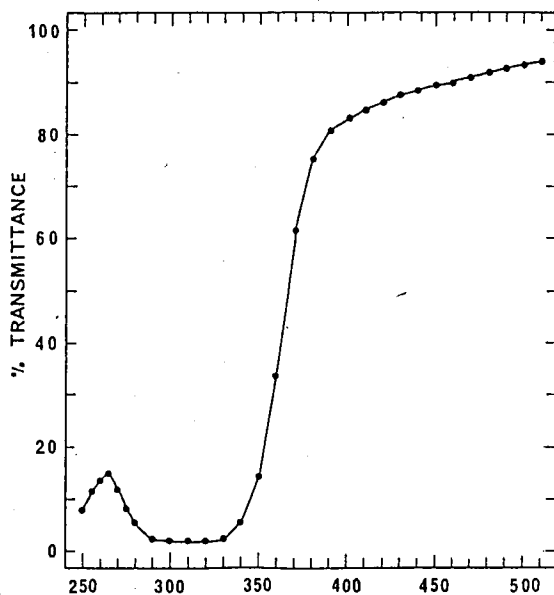


図2 ホウライシダ胞子壁の透過スペクトル

題にするのみでは正確な情報を得られない場合も多い。シダ胞子を用いた我々の実験からこのことについて一二の問題点を挙げさせていただきたい。

例えばその一つとして照射光の受容体色素以外の物質による散乱、吸収等により真の作用スペクトルが得られない場合がある。

ホウライシダ、モエジマシダなどの胞子は暗所では発芽せず、赤色光により発芽が誘導され、近赤外光によって可逆的に抑制されることからフィトクロム系の関与が明らかである。さらに青色光も胞子発芽を抑制するが、この抑制は直後に与えた赤色光によっては回復しないことからフィトクロム以外の光受容体色素の関与が考えられる。この光受容体色素の特定のための一手段として基生研大型スペクトログラフを利用して 250 nm から 500 nm までの領域の単色光を赤色光照射後にホウライシダ胞子に与え発芽抑制の作用スペクトルを測定した。その結果図 1 に示すように 440, 380 nm 付近に顕著なピークが、さらに 260 nm 付近にも低いピークが認められ

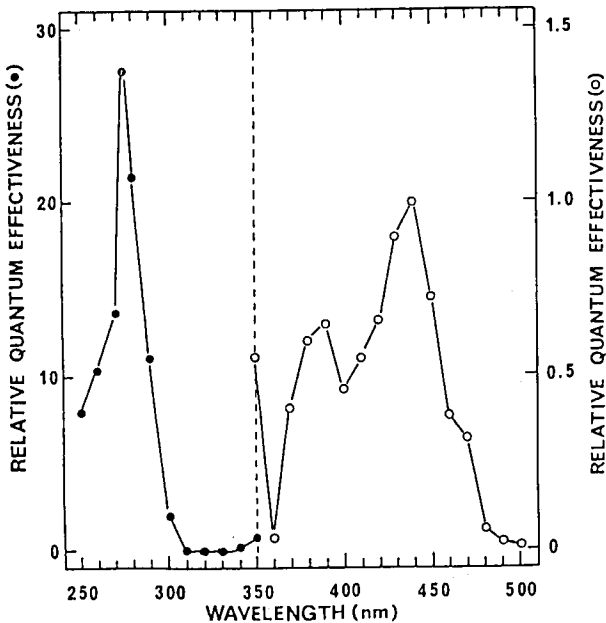


図3 胞子壁の透過スペクトルにより補正したホウライシダ胞子の発芽抑制の作用スペクトル

た。

ところでホウライシダの胞子は褐色の外被(胞子壁)に覆われている。胞子壁の光の透過率を顕微分光光度計により測定したところ、図2のようになった。胞子壁は短波長の光をきわめて透過しにくいことがわかる。この結果をもとに作用スペクトルの補正を試みたところ、図3のように紫外部のピークが近紫外、青色光と比べて著しく高くなった。このことは作用スペクトルを光受容体の推定に用いることには慎重さが必要なことを示している⁴⁾。

つぎに、作用スペクトル測定と他のパラメーターとを組み合わせ、光受容体に関する情報を得る例を挙げてみよう。

青色光によるモエジマシダ胞子の発芽抑制効果はKCN, NaN_3 等の呼吸阻害剤やエタノールによって解除されることが知られている^{2,3)}。これらの薬物の効果の波長依存性について調べたところ表2のようになり、紫外

表2 赤色光により誘導されるモエジマシダ孢子発芽抑制を解除する呼吸阻害剤およびエタノールの効果の波長依存性 (発芽を50%抑制するのに必要なエネルギー量で表した)

Wavelength	260 nm	380 nm	440 nm
Control	700 J/m ² (1)	44 J/m ² (1)	11 J/m ² (1)
KCN (1 mM)	3,200 (4.57)	20,000 (455)	3,000 (273)
NaN ₃ (1 mM)	660 (0.94)	95 (2.15)	33 (3.0)
Ethanol (100 mM)	850 (1.21)	330 (7.3)	60 (5.45)

光の発芽抑制効果には殆ど影響しないことがわかった⁵⁾。この事実からシダ孢子発芽を抑制する紫外 - 青色光の作用には2種あるいはそれ以上の光受容体が関与する可能性が考えられる。

3. 微生物をもちいた光形態形成の研究に望むこと

微生物をもちいた光形態形成の研究には、多くのメリットがある。例えば、培養が比較的容易なものが多いこと、特に単細胞のものでは大量培養が容易なこと、ライフサイクルが短いこと、半数体世代のものが多く突然変異体を用いた研究が容易なこと、一般に代謝活性が高く生化学研究が進め易いことなどが挙げられる。これらの特徴を充分に活かして研究が進められることを希望する。

とくに高等植物ではなかなか困難が伴う突然変異体を用いての青色光反応の光受容体色素の探索には大きな期待を抱いている。

またいままでもCa²⁺ 以外は殆ど植物では手がつけられていない二次、三次メッセンジャーを介する光情報の生体内伝達の機構、さらには遺伝情報と環境情報の発現機構等の研究の格段の進展を期待したい。

参考文献

- 1) Senger, H. and Schmidt, W. (1986). Cryptochrome and UV receptors-Diversity of photoreceptors. *In* Photomorphogenesis in plants (Ken-

drlich, R.E. *et al.* eds.) Martinus Nijhoff Pub, Dordrecht/Boston/Lancaster.

- 2) Sugai, M. (1971). *Dev. Growth & Diff.* **12**, 13-20.
- 3) Sugai, M. (1982). *Plant & Cell Physiol.* **23**, 1155-1160.
- 4) Sugai, M. and Furuya, M. (1985). *Plant & Cell Physiol.* **26**, 953-956.
- 5) 菅井道三 未発表.



ワークショップ「微生物と光」の おわりに

大 瀧 保

本ワークショップでは、種々の異なる生物における光反応の特徴を概観し、共通する問題点を探ることを目標の一つとした。光合成細菌、真性および細胞性粘菌、菌類、そして藻類と、「微生物」と言う概念からやや逸脱した比較的大型の生物も含まれてはいるが、その大部分は主として青色光によって制御を受けているものである。

これら生物の光反応解析のために今回使用された方法をみると、分子生物学的手法を含む遺伝学的解析、実験形態学的な解析、電気生理学的な解析、そして細胞生理学的な解析と多岐にわたり、それぞれ異なった面から光反応を浮き彫りにした。これを光捕獲から反応に至るまでの長い反応過程の上に重ねてみると、分光光学的手法を用いた解析(渡辺、熊谷、菅井)は光捕獲機構の解明に、電気および細胞生理学的な解析(上田、片岡)は光刺激受容後の伝達機構の解明に、そして生物の行動や形態形成の解析(前田、大瀧、鎌田)は反応系の最終段階である反応発現機構の解明に主として関与していると思われる。光受容体としてはバクテリオロドプシン、マイコクローム、カロチンそしてフラビンなどの関与が示唆され、刺激伝達のメッセンジャーとしては Ca^{2+} や cAMP などの関与、そして形質発現にはある物質の生産が伴っている可能性もあることが示唆された。

このような研究を通して得られた共通の認識は、これらの生物に光反応に関する突然変異体が得られ、それが研究に利用されれば、その解析は一段と精度が高まり、またより多くの情報が得られ、研究が更に進展するで

あろうと言うことであった。これらの“微生物”は高等生物に比べて体制が一般に単純であり、コメンテーター（菅井）から指摘があったように、高等生物に比べより容易に突然変異体を単離できる利点がある。特に有性生殖と無性生殖の生活環が互いに独立に存在し、しかも半数体の栄養体を持つ菌類では突然変異体を得ることは比較的容易であり、この特性を研究上最大限に利用すべきである。接合菌類のヒゲカビや担子菌類のヒトヨタケなどでは突然変異株を駆使して解析が進んでいるが、紅色光合成細菌を用いた研究（伊藤）では、これをさらに分子のレベルまで発展させ、他の系統や他の種の菌の遺伝子を直接宿主菌に導入し、菌の遺伝子的背景を変革せしめる試みである。このような手法は、他の生物においても光反応の本質を解明する場合、考慮しなければならないものであり、その意味で紅色光合成細菌での報告は一つの研究の方向を示すものであった。

確かに単細胞性生物は、体制は単純ではあるが、一個の生命体として生命活動を維持するための全ての機構を備えていなければならない。そのために機能の分化した高等生物よりは系がより複雑であると言う見方も存在するが、コメンテーターの指摘する通り、やはり体制の比較的単純なこれら“微生物”は、光刺激受容部位と反応部位が接近している点で、その解析が容易な面も存在する。今後はこれら微生物の持つ有利な点を最大限に活用して研究を進めるべきであろう。そのためには、できるだけ突然変異体を使用した実験系の確立が当面の課題のように思われた。

IGE シリーズ 2

微 生 物 と 光

発 行 1989 年 2 月
発行所 東北大学遺伝生態研究センター
〒 980 仙台市片平 2-1-1
☎ 022-227-6200 (代)
印刷所 笹氣出版印刷株式会社